

DECLARACIÓN LEGAL

EDITORES:

Cristina E. Solano Sosa
María Eugenia Sánchez Morales
Gloria Verónica Vázquez García
Amalia Martínez García
Eva Liliana Ramos Guerrero

Publicación electrónica
ISBN GENERAL 978-607-8358-86-1
Tomo I: Biología y Química
ISBN 978-607-8358-87-8

El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores.

Temacilli EDITORIAL
Lagos de Moreno, Jalisco
<http://temacilli-editorial.com>

D. R. Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.
Loma del Bosque 115, Col. Lomas del Campestre
C. P. 37150 León, Guanajuato
México
Hecho en México
Octubre de 2020



Miscelánea Científica en México

Tomo I:

Biología y Química

PREFACIO

El presente compendio reúne trabajos de investigación realizados en diversas áreas de la ciencia, cuyo objetivo principal es contribuir a la difusión del trabajo científico que se realiza en México. Con este compendio también se pretende promover el trabajo interdisciplinario entre miembros de diferentes disciplinas científicas.

Este trabajo está organizado en siete tomos los cuales corresponden a las siguientes áreas científicas: I) Biología y química, II) Biotecnología y ciencias agropecuarias, III) Ciencias sociales, IV) Físico matemáticas y ciencias de la tierra, V) Humanidades, ciencias de la conducta y divulgación científica, VI) Ingeniería, así como VII) Medicina y ciencias de la salud.

Octubre de 2020
León, Gto., México

Cristina E. Solano Sosa
María Eugenia Sánchez Morales
Gloria Verónica Vázquez García
Amalia Martínez García
Eva Liliana Ramos Guerrero

Contenido

ACTIVIDAD ANTIRRADICAL, ANTIHIPERGLICEMIANTE Y TOXICIDAD DE MORINDA CITRIFOLIA L. (NONI)	4
REMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA DEL RÍO TURBIO MEDIANTE HUMEDALES ARTIFICIALES	13
PRODUCCIÓN DE 5-HIDROXIMETIL-2-FURFURALDEHÍDO (HMF) A PARTIR DE FRUCTOSA, GLUCOSA, ESTEVIA Y MANITOL CARACTERIZADO POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA, HPLC Y FT-IR	26
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIHEMOLÍTICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE <i>CYBOPOGON CITRATUS</i> SOBRE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.	40
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL ZNO-M (M= CO, CU, FE Y MG) EN LA DEGRADACIÓN DEL COLORANTE NARANJA DE METILO	47
ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UN PRODUCTO CAPILAR CON EXTRACTO DE OPUNTIA FICUS	56
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE CASTELA TEXANA SOBRE BACTERIAS PRESENTES EN TRASTORNOS DE CARIES DENTAL Y GINGIVITIS	60
ANÁLISIS DE FACTORES PARA ELABORACIÓN DE UNGÜENTO PARA ALIVIAR QUEMADURAS DE PRIMER GRADO	69
DETERMINACIONES BIOQUÍMICO- CLÍNICOS DE 3 ANALITOS EN ANIMALES EN CAUTIVERIO.	77
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Kalanchoe daigremontiana</i> PLANTA EXOTICA INVASORA	82
SÍLICE MESOPOROSA COMO NANO-EXCIPIENTE DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y PROLONGADA PARA LA GLIBENCLAMIDA	87
CARACTERIZACION DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LA PARED DE ESPORAS DE <i>AGARICUS BISPORUS</i> VAR <i>PORTOBELLO</i> , MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.	94
GENERACIÓN DE DOS COMPLEJOS DE METFORMINA CON COBRE (II) DE BAJO COSTO A PARTIR DE MEDICAMENTO CADUCO	99
EFFECTO DEL SDHEA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR SULFITO DE SODIO SOBRE LA OVOPOSICIÓN EN EL ORGANISMO MODELO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	107
DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE FORMACION DE $[Zn(Bnzd)_2(NCS)_2(OH_2)_2]$ CON Pb (II) y Sn (II) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE LUMINISCENCIA EN MEDIOS ORGANICOS POLARES	113
REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS MEDIANTE CARBÓN ACTIVADO UTILIZANDO EL RESIDUO AGRÍCOLA DE ESPÁRRAGO COMO PRECURSOR	124
PREPARACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO POR GELIFICACIÓN INVERSA PARA LA RECUPERACIÓN DE ORO (III)	135
PRODUCCIÓN DE GELATINASAS (PROTEASAS) POR BACTERIAS AEROTRANSPORTADAS	144
EVALUACIÓN DE DOS PLANTAS AROMÁTICAS SOBRE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ...	150
IMÁGENES TOPOGRÁFICAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>KLEBSIELLA VARIICOLA</i>	159

PODER ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE TOMILLO (<i>thymus vulgaris</i>) EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA, ORO Y COBRE.	165
SISTEMAS BIOADHESIVOS PARA LA INCORPORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS NATURALES CON APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRIA.....	176
POTENCIAL ANTI- <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> DE PROBIÓTICOS	182
EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE REDUCCIÓN EN EL TAMAÑO FINAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE NIQUEL SOPORTADAS EN ZEOLITA ZSM-5 CON RELACIÓN SI/AL:40	193
EFFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Elettaria Cardamomum</i> y <i>Citrus Paradisi</i> CONTRA <i>Candida Albicans</i>	201
MICROENCAPSULACIÓN DEL LÍQUIDO IÓNICO CYPHOS IL-101 CON BIOPOLÍMEROS PARA LA RECUPERACIÓN DE PD(II).....	206
APLICACIÓN DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EN LA INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES.....	211
ESTUDIO DEL MECANISMO DE EXTRACCIÓN DE DICLOFENACO POR MEDIO DE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS.	221
ABUNDANCIA DE ÁCAROS EDÁFICOS EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN EL CERRO DEL ÁGUILA	236
RELACIÓN TALLA-PESO DE <i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i> , UN LANGOSTINO QUE HABITA EN LA MIXTEQUILLA, VERACRUZ (MÉXICO)	242
EFFECTO DE INFUSIONES DE MANZANILLA, HIERBABUENA Y CITRONELA EN EL ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS EXPUESTO A PERÓXIDO DE HIDROGENO	249
IDENTIFICACIÓN DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS ESPECIALIZADAS EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> A PARTIR DE FUENTES HUMANAS.	254
ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EN EL RÍO QUERÉTARO	260
RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS QUÍMICOS Y CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN SUELOS DE LA RIVERA DEL LAGO DE CUITZEO	271
POSTBIÓTICOS ENCAPSULADOS COMO INHIBIDORES <i>IN VITRO</i> DE <i>ENTAMOEBAS HISTOLYTICA</i>	279
PRODUCTOS DE HIGIENE BUCAL CON UN ENFOQUE SUSTENTABLE	292
EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE CEPAS COMERCIALES DEL GÉNERO <i>PLEUROTUS</i> Y SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	299
OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO A BASE DE FIBRA DE NOPAL	305
DESARROLLO DE FORMULACIÓN FARMACÉUTICA ORAL DE DICLOFENACO ADSORBIDO EN EXCIPIENTE DE SÍLICE POROSA DE CASCARA DE ARROZ.....	310
LA LEPTINA EN EL NTSC AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OB-RB Y POTENCIA LA RETENCIÓN DE GLUCOSA CEREBRAL INDUCIDA POR NACN EN EL SENO CAROTÍDEO EN RATAS	319
ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs670 Y rs5069 EN EL GEN <i>APOA1</i> CON CÁNCER DE MAMA EN POBLACIÓN MEXICANA DE OCCIDENTE.	325
ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y <i>GEOBACTER SULFURREDUCTENS</i>	334

REMEDIACIÓN DE AGUA DEBIDO A CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE POR VÍA ELECTROQUÍMICA CON IMPACTO A LA SALUD.....	339
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS SOBRE CEPAS MULTIFARMACORRESISTENTES.....	346
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO Y SENCILLO PARA LA DETERMINACIÓN DE LEVETIRACETAM MEDIANTE HPLC-UV.....	355
CINÉTICA DE INTERCAMBIO IÓNICO ENTRE LA ZEOLITA ZSM-5 (SI/AL:40) Y EL CATIÓN Ni^{+2} EN SOLUCIÓN DE $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	364
ANÁLISIS DE RESPUESTA DE SUPERFICIE PARA OPTIMIZAR LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ORIGEN HEMATOPOYÉTICO DESTINADAS AL ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	372
ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UN PRODUCTO CAPILAR CON EXTRACTO DE OPUNTIA FICUS.....	380
PRIMER REGISTRO DE UNA COLONIA DE <i>LEPTONYCTERIS NIVALIS</i> EN LA MINA EN SANTA ROSA I, MUNICIPIO DE MAZAPIL, ZACATECAS.....	384
ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA DE LA CALAVERA (<i>CUPHEA PROCUMBENS</i>) UTILIZANDO FTIR.....	400
INDICE DE AUTORES.....	406

ACTIVIDAD ANTIRRADICAL, ANTIHIPERGLICEMIANTE Y TOXICIDAD DE MORINDA CITRIFOLIA L. (NONI)

Karla Ivonne Escamilla Gallegos, Rahim Foroughbakhch Pournavab, Catalina Rivas Morales, Jorge Alberto Villarreal Garza y David Mizael Martínez Ortiz

Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
jorge.villarrealga@uanl.edu.mx

RESUMEN

El propósito de esta investigación consistió en realizar un experimento con distintas partes de *Morinda Citrifolia*, tales como hoja, semilla, pulpa y raíz. Este trabajo se realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Partiendo desde la hipótesis de que estas partes de la planta inhiben la enzima α -glucosidasa, por lo que puede ser considerado un producto anti-hiperglucemiante in vitro. El experimento consistió en primero obtener los extractos metanólicos de cada una de las partes de la planta, para posteriormente identificar los metabolitos secundarios que tienen atreves de realizar el tamizaje fitoquímico. Una vez obtenido los extractos se procedió a realizar las distintas pruebas, comenzando por la inhibición de la enzima α -glucosidasa; para ello, se colocaban los extractos en distintas concentraciones en una microplaca para después utilizando una pipeta agregar la enzima, el pNPG, y la solución de parada y finalmente proceder a leer la microplaca en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405nm. Después se realizó la prueba de hemólisis para comprobar si alguno de los extractos presentaba algún grado de toxicidad; para ello se utilizó muestras de sangre de donadores sanos, las cuales fueron centrifugadas y preparadas para eliminarles el plasma, se prepararon distintas concentraciones de los extractos y se les adiciono la sangre para dejarlos incubando por 30 min, una vez pasado ese tiempo se centrifugaron las muestras y se pasó el sobrenadante a una microplaca para ser leída en el espectrofotómetro a 540nm. Para determinar la actividad antioxidante se agregaron los extractos a distintas concentraciones en microplaca para después adicionar dpph a la caja, dejándolo incubar en oscuridad para proceder a leer la placa a 517nm en el espectrofotómetro. Para analizar todos estos datos se utilizó un programa estadístico de ANOVA simple y PROVIT con ayuda del SPSS. Con los resultados de las pruebas antes descritas, se concluyó que ninguno de los extractos muestra toxicidad, sin embargo, solo el extracto de semilla presento actividad como inhibidor del α -glucosidasa y es el que cuanta con mayor número de metabolitos secundarios.

Palabras Claves: **pNPG**: 4-nitrofenil- β -D- glucopiranosido, **DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

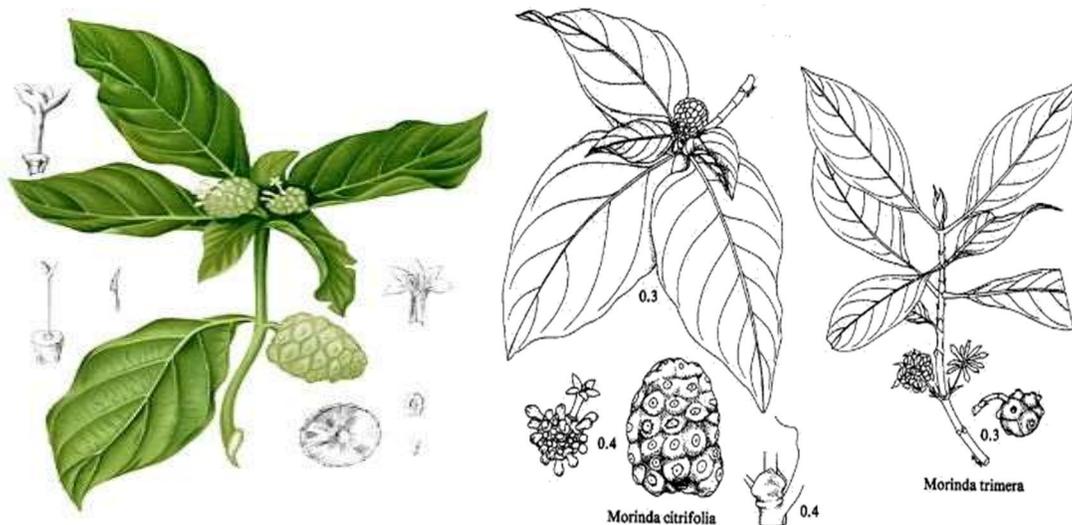
INTRODUCCIÓN

A lo largo de los siglos, las plantas han sido utilizadas con fines medicinales para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades, ya sea desde una gripa hasta ayudar a combatir el cáncer. Científicos y médicos profesionales han mostrado un incremento en el interés por estas plantas medicinales; más de 400 tratamientos x con plantas para la diabetes mellitus han sido registrados, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia. Los tratamientos tradicionales están desapareciendo en las sociedades occidentales, pero algunas son prescritas por los practicantes de la medicina alternativa o tomados por los pacientes como complementos de las terapias convencionales (García, et al, 2009). Una de estas plantas es el Noni o *Morinda citrifolia* L. la cual es originaria de una región que comprende el sureste asiático hasta Australia y es cultivada en Polinesia, India, el Caribe, México, América central y parte de América del sur. Por más de 2000 años los polinesios han usado la planta de noni con fines medicinales. En la farmacopea tradicional se recomienda consumir noni para prevenir y curar diversas enfermedades; se usa para estimular el sistema inmune y de esa forma combatir bacterias, virus, parásitos e infecciones fúngicas, prevenir formación y proliferación de tumores, incluyendo algunos de tipo maligno, así como mejoría en pacientes con diabetes tipo I y II, enfermedades cardiacas, obesidad, hipertensión, desordenes digestivos, etc. Por su parte, en la Medicina Alternativa actual, el jugo del Noni se ha utilizado para tratar diferentes tipos de enfermedades tales como la diabetes, la hipertensión, problemas menstruales, cefaleas, enfermedad cardíaca, sida,

cáncer, úlceras gástricas, esguinces, depresión mental, senilidad, problemas digestivos, aterosclerosis, problemas vasculares y drogadicción, a pesar de la todavía limitada pero prometedora evidencia científica (Torres y Toranzo, 2004). Dos estudios clínicos reportan alivio a la artritis y diabetes asociado al consumo de noni debido a los compuestos presentes en este, como son la escopoletina, alcaloides y esteroides, así como su potencial antioxidante. Como resultado de esto, el consumo de esta fruta es actualmente alto, no sólo en los países productores, sino también en los Estados Unidos, Japón y Europa (Chan-Blanco, et al., 2005). En base a lo anterior se determinó el efecto hipoglucemiante de *Morinda citrifolia* L. sobre α -glucosidasa utilizando diferentes componentes de la planta (la raíz, hojas, fruto y semilla), también se evaluó la toxicidad y la actividad antioxidante. Determinar la inhibición de la α -glucosidasa, actividad antioxidante y tóxica de extractos de la planta de *Morinda citrifolia*.

TEORIA

Noni es un arbusto o árbol pequeño de 3 a 10 m de altura, con abundantes hojas elípticas (5-17 cm largo, 10-40 cm ancho). Sus flores están dispuestas en cabezuelas globosas, con el cáliz truncado y la corola tubular de color blanco. El fruto es oval (3-10 cm largo, 3-6 cm de ancho) y su color varía de verde a amarillo, con una cáscara cubierta de pequeñas protuberancias, las cuales contienen una semilla. (Ulloa et al., 2012). La semilla es discoidal, de 0.4 a 0.6 cm. de diámetro y de color marrón, provista de una bolsa de aire que le permite flotar en el agua (Acosta, 2003). su pulpa es de color chocolate y densa. Tiene un sabor amargo y mal olor que no impide su consumo ya que éstas características son rebasada por sus propiedades nutricionales.



El noni tiene varios constituyentes químicos, primero una cantidad notable de compuestos de terpenos (acubina, L-asperulósidoL y glucosa) que han sido identificados por sus derivados de acetil. El ácido caproico y caprílico ha sido aislado de esta planta. Además, posee una cantidad considerable de vitamina C. Tercero el noni Hawaiano ha sido vinculado con la síntesis de xeronina en el cuerpo. También se han identificado aproximadamente 51 compuestos del aroma en la fruta madura de noni, incluyendo ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, cetonas y lactonas (Farine et al., 1996). *M. citrifolia* L. (noni) es una planta que ha cobrado gran interés en los últimos años por causa de múltiples propiedades medicinales atribuidas a sus frutos, raíz, corteza, semillas y, en particular, sus hojas que poseen actividad antiinflamatoria, astringente, antiséptica e hipoglucemiante (Izquierdo O., 2009).

Al noni se le atribuyen propiedades curativas gracias a las sustancias que contiene, entre ellas la norepinefrina, la damnacanthal y la xeronina; la norepinefrina es un derivado de la adrenalina que estimula el sistema nervioso simpático; la damnacanthal, una sustancia natural que se utiliza para

combatir el cáncer y la xeronina, un alcaloide que ocasiona reacción en el núcleo de la célula, haciendo que las personas se sientan con mayor energía física y mental (González, y González, 2003).

La diabetes es una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce, se conocen dos tipos que son: La diabetes de tipo 1 (diabetes insulino dependiente o juvenil) se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina. La diabetes de tipo 2 (diabetes no insulino dependiente o del adulto) tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, lo que a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física. En 2014, el 8,5% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes. En 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes y los niveles altos de glucemia fueron la causa de otros 2,2 millones de muertes (OMS, Ginebra, 2016).

PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras vegetales procedente de zonas tropicales del sureste de México serán proporcionadas por el señor Joel Hernández Vargas de la empresa Hervar Fam ubicada en Monterrey, Nuevo León. El material vegetal será entregado en forma integral en base a la materia fresca donde se procederá a su identificación, separación y secado para su posterior preparación de extractos. Del material vegetal de *M. citrifolia* se separará en raíz, pulpa, hoja y semilla; se secarán a la sombra a temperatura ambiente. Cada parte de la planta se tritura en una licuadora Osterizer 4655 B315-T2 por separado. Posteriormente se tomarán 100 –150 g de raíz, 100 – 200 g de pulpa, 100 -120 g de hoja, 100- 120 g de semilla y cada muestra se depositará en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se le agregará metanol suficiente para cubrir la muestra. Se sellará herméticamente para evitar evaporación de este durante la extracción. Se pondrá en agitación constante a temperatura ambiente, durante 3 d. Una vez que las extracciones se realizaron, los disolventes se separarán por filtración, posteriormente se eliminarán con ayuda de un rotavapor Yamato BM100 a presión reducida y finalmente se evaporarán hasta sequedad a temperatura ambiente y se determinará sus rendimientos de acuerdo a las metodología reportada por Silva (2005).

Tamizaje fitoquímico

Los extractos de raíz, pulpa, hoja y semilla obtenidos de *M. citrifolia* serán sometidos a pruebas químicas para identificar compuestos y grupos funcionales, esto de acuerdo a las metodologías descritas por (Verde-Star et al., 2016) Estas pruebas son:

7.3.1 Prueba de permanganato de potasio (Dobles enlaces): Se disolverán 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se añadirá gota a gota una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua; la prueba será positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café de bióxido de manganeso.

7.3.2 Prueba de 2, 4-dinitrofenilhidrazina (Grupo carbonilo): A 100 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4, DFNH) + 10 mL de etanol ETOH + 3 mL de ácido clorhídrico HCL aforar a 100 mL con agua destilada, se añadirá unas gotas de este reactivo a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indicará la presencia de un grupo carbonilo.

7.3.3 Prueba de Liebermann-Burchard (Esteroles y triterpenos): El reactivo se preparará mezclando 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añadirá a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, la aparición de un color azul o morado será prueba positiva para esteroles y color rojizo para triterpenos, en el lapso de una hora, particularmente los insaturados.

7.3.4 Prueba de NaOH (Cumarinas): Se disolverán 1-2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10%; si aparece una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba será positiva.

7.3.5 Prueba de Baljet (Sesquiterpenlactonas): Se utilizará 2 soluciones que se mezclarán en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se preparará pesando un gramo de ácido pícrico y disolviéndolo en 100 mL de etanol; para la solución B se pesará 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 100 mL de agua. Para la prueba se pondrá de 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, será positiva si se forma coloración anaranjada o rojo oscuro.

7.3.6 Prueba de H₂SO₄ (Quinonas): 2 a 3 mg de muestra se le añadirá 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico para prueba positiva de quinonas, se coloreará de rojo y se confirmará al añadir 2-3 gotas de hidrosulfito de sodio al 5% decolorando la solución y se regenerará el color añadiendo de 2-3 gotas de agua oxigenada al 30%

7.3.7 Prueba de NaHCO₃ (Grupo carboxilo): Se agregará unas gotas de la solución de bicarbonato de sodio al 10% en agua a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua o etanol. La prueba será positiva si se observa el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

7.3.8 Prueba de FeCl₃/EtOH (Taninos): Se disolverá la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5% en etanol; la coloración verde oscura o negra será prueba positiva.

7.3.9 Prueba de espuma (Saponinas): En un tubo de ensaye se colocará la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de agua, se sacudirá y si se forma una espuma abundante y permanece más de 15 min, la prueba será considerada positiva.

7.3.10 Prueba de Shinoda (Flavonoides): Se disolverán 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna color rojo intenso, la prueba será positiva, otro color como anaranjado, verde o azul podrán estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, o xantonas.

7.3.11 Prueba de la Antrona (Carbohidratos): En un tubo de ensaye se colocará 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, después se dejará resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado; la prueba será positiva si en la interfase aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

7.3.12 Prueba de Dragendorff (Alcaloides): Usándolo como revelador en cromatografía aparecerá la mancha color naranja que deberá persistir más de 24 h y prueba directa al extracto, será colocar una pequeña cantidad de muestra disuelta en etanol y agregar una o dos gotas del reactivo, si se observa un precipitado naranja será positiva para alcaloides.

Toxicidad Hemólisis

Se empleó el método de hemólisis con ligeras modificaciones. Se obtuvo sangre humana de un donador sano voluntario, fue mezclada con EDTA para prevenir la coagulación y para luego ser separada del suero centrifugándola a 1,000 rpm por 5min a 37°C, para lo cual se utilizó una centrífuga CLAY ADAMS® SERO-FUGE®. Los eritrocitos fueron lavados cuatro veces en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH= 7.4, eliminándose el sobrenadante por succión cuidadosa con una pipeta Pasteur. Los eritrocitos se utilizaron posteriormente para preparar una suspensión de estos (SCR) al 5% v/v en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4). Esta suspensión de glóbulos rojos se preparó para ser utilizada ese mismo día.

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos sobre los eritrocitos, los glóbulos rojos previamente obtenidos se incubaron con diferentes concentraciones de los extractos durante 30 min a 37 °C protegidos de la luz y envueltos en papel aluminio en una incubadora (FELISA® FE-291). Como control negativo se determinó la hemólisis espontánea añadiendo la suspensión de glóbulos a PBS y como control positivo se añadió agua destilada para producir hemólisis osmótica de los eritrocitos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el grado de hemólisis se determinó mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm de la absorción de la hemoglobina liberada en el sobrenadante, en el lector de microplacas (BIOTECK EPOCH); estas lecturas fueron registradas como "Absorbancia

del tratamiento a la concentración dada en partes por millón (Abs Tx)". Por último, se calculó el porcentaje de hemólisis utilizando la fórmula: % Hemólisis = $\left[\frac{Abs Tx - Abs Ctrl (-)}{Abs Ctrl (+) - Abs Ctrl (-)} \right] \times 100$.

Prueba para la inhibición de α -glucosidasa

Los extractos de *Morinda citrifolia* se probarán a las siguientes concentraciones: 4, 8, 12, 16, 20, 24 ppm, haciendo dilución seriada 1:1.

La suspensión enzimática, la solución de pNPG (α -D-glucopiranosido) y las soluciones de los tratamientos se preparan en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM a pH 6.9. A continuación se describe el procedimiento del ensayo con algunas modificaciones. Se colocan 25 μ L de una suspensión enzimática preparada previamente, se mezcla con 25 μ L de una solución del tratamiento (producto y controles), se incuba por 10 min/37°C; posteriormente se adicionan 50 μ L de la suspensión de pNPG y se procede a incubar nuevamente por 10 min/37°C, se interrumpe la reacción agregando 50 μ L de carbonato de sodio 0.2 M. Finalmente se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm y se determina el % de inhibición con la siguiente ecuación.

% de inhibición de α glucosidasa = $\frac{(Abs control - Abs muestra)}{(Abs control)} \times 100$

Dónde:

Abs muestra es la absorción de luz por parte del producto de reacción en presencia de la muestra.

Abs control es la absorción de luz por parte del producto de reacción sustituyendo la muestra por solución amortiguadora.

Las concentraciones de la muestra probadas y los porcentajes de inhibición se analizan con ayuda de un paquete estadístico para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que es la cantidad de producto probado que es necesario para inhibir en un 50% la actividad de la enzima (Ortiz-Martínez, D.M., Cordero-Pérez, P., & Leos-Rivas, C. 2016).

Actividad Antioxidante (DPPH)

La capacidad de captura de radicales libres se determinará utilizando el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH - Sigma-Aldrich, Alemania).

Para este ensayo estandarizado se tomará una alícuota de 100 μ L de solución en metanol, de la muestra a seis concentraciones distintas (100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L). Se adicionan 900 μ L de DPPH en solución metanólica de concentración 60 μ L y se mezclan. Se incubarán los tubos de reacción por 30 min en oscuridad. Se medirán su densidad óptica a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Se utilizará como control positivo el tocoferol en solución etanólica 40, 50, 60, 70, 80 mg/L. (por triplicado) Se determinará el porcentaje de inhibición del radical DPPH con la sig. ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición del DPPH} = \frac{A \text{ blanco} - A \text{ muestra}}{A \text{ blanco}} \times 100 \quad (1)$$

Ecuación 1: Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH

Dónde: A es la absorbancia.

Una vez que se determine el valor del porcentaje de inhibición de cada una de las concentraciones, se procede a realizar una regresión lineal con dichos valores, de tal manera se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = mx + b \quad (2)$$

Ecuación 2: Ecuación de la recta

(Leos-Rivas, 2016). Los datos serán analizados usando el programa estadístico Probit para obtener la concentración inhibitoria media CE₅₀ de los extractos y controles (García-Becerra, 2012.)

Análisis estadístico de resultados

La información obtenida de los resultados de la α -glucosidasa de los componentes de planta de noni se sometieron a un análisis de varianza simple con apoyo del paquete estadístico SPSS (Vers. 22), esto con la finalidad de verificar si existen diferencias significativas entre los diferentes componentes de la planta referente al contenido en α -glucosidasa. Los valores promedios serán comparados

mediante la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey (Zar, 1996.). Las relaciones funcionales entre el contenido de α -glucosidasa y los componentes de plantas de verificará mediante el análisis de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Ya obtenidos los extractos, se evaluaron los rendimientos de cada uno de ellos y el que presento un mayor rendimiento fue el EMP con un 7.9% (Tabla 1) mientras que el EMS presenta el menor rendimiento con un porcentaje de 1.7

Tabla1. Rendimiento de los extractos de *M. citrifolia*

Extracto	Peso (g)	Disolvente (ml)	Rendimiento (%)
EMS	111	300	1.7
EMH	105	350	3.7
EMR	138	600	5.9
EMP	179	300	7.6

Tamizaje fitoquímico

De las distintas pruebas químicas para el tamizaje fotoquímico el extracto metanólico de semilla (EMS) fue el que conto con mayor número de resultados positivos, contando este con 9 de 12 metabolitos secundarios como muestra la tabla 2, seguido del extracto metanólico de la raíz con 7 de ellos.

Tabla2. Tamizaje Fitoquímico de los diferentes extractos de *M. citrifolia*

Prueba Química	Grupo Funcional	EMP	EMR	EMS	EMH
Permanganato de potasio	Dobles enlaces	-	-	+	
2,4-dinitrofenilhidrazina	Grupo carbonilo	+	-	+	-
Liebermann-Burchard	Esteroles y triterpenos	+	+	+	+
NaOH	Cumarinas	+	+	+	-
Baljet	Sesquiterpenlactonas	-	+	+	-
H ₂ SO ₄	Quinonas	+	+	+	-
NaHCO ₃	Grupo carboxilo	-	-	+	+
FeCl ₃ /EtOH	Taninos	+	+	+	-
Espuma	Saponinas	-			
Shinoda	Flavonoides		+		
Antrona	Carbohidratos	+	+	-	+
Dragendorff	Alcaloides	-	-	+	-

Hemolisis

Los 4 extractos de *Morinda citrifolia* presentaron un efecto no toxico, puesto que no presentaron una lisis celular, y no afecta la estabilidad de la membrana de los eritrocitos.

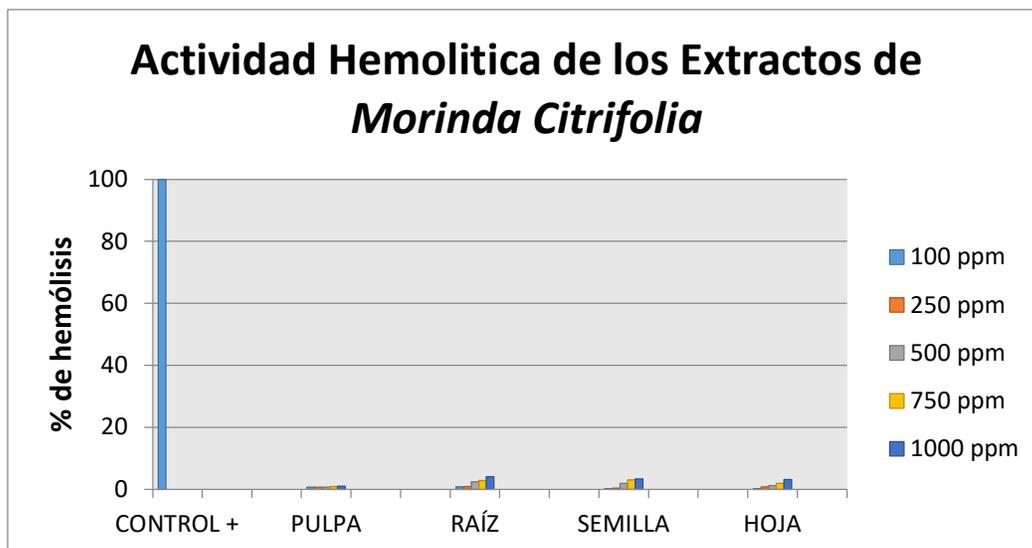


Figura 3 Grafica de la act. Hemolítica de los extractos de *M. Citrifolia*

Esta hemolisis está relacionada con la concentración y potencia toxica de un extracto, además, de que el resultado de cada extracto depende enteramente de su composición química, los resultados obtenidos nos sugieren que pueden ser utilizados para la preparación de medicamentos involucrados en el tratamiento de diversas enfermedades como la diabetes.

DPPH

Todos los extractos fueron sometidos a la prueba de DPPH, sin embargo, solo el extracto de semilla presento una actividad antioxidante. Se decidió utilizar al tocoferol como control positivo debido a su capacidad secuestradora de radicales libres.

Tabla 4.- Prueba de DPPH para antioxidantes

Tratamiento	Prueba de DPPH (EC50)
Semilla	185.111 ± 19.212
Tocoferol (+)	46.594 ± 0.928

El EC50 se define como la cantidad de extracto necesaria para reducir al 50% la concentración de DPPH. Mientras más bajo sea el valor de EC50, mayor es la actividad eliminadora de radicales libres

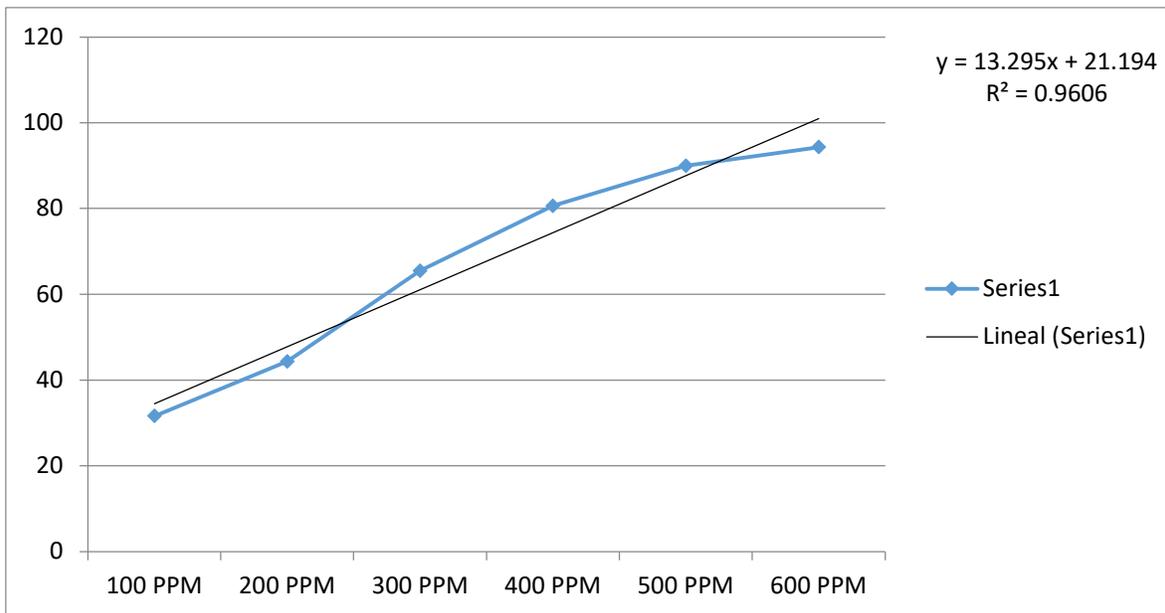


Figura 4. Grafica de act. Antioxidante del EMS

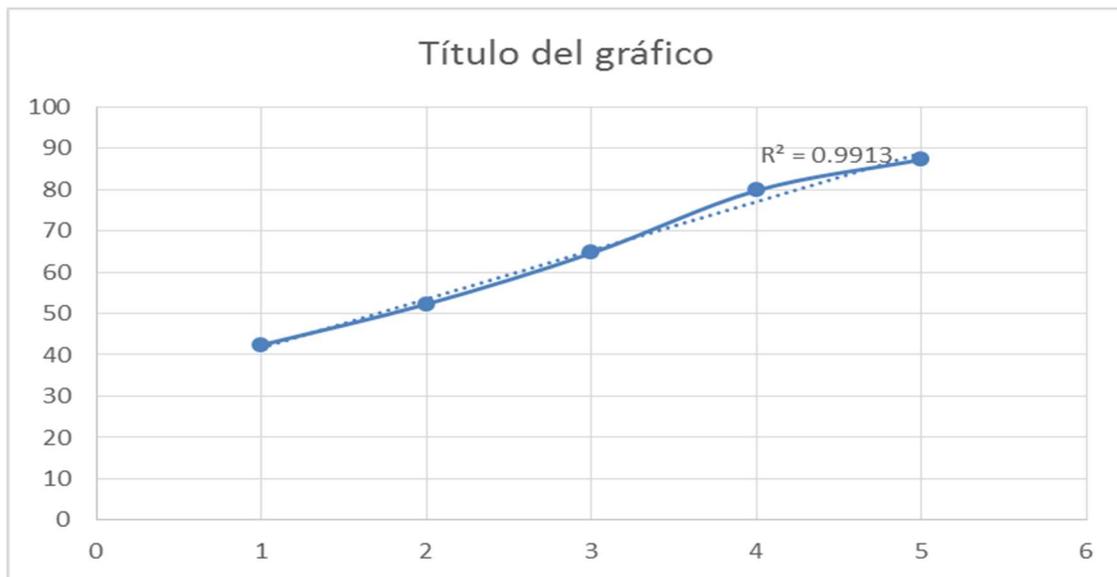


Figura5. Grafica de act. Antioxidante del Contol + (Tocoferol)

Los inhibidores de α -glucosidasa son un grupo de medicamentos que son utilizados por pacientes con diabetes para reducir los picos en sus niveles de glucosa.

Los más comunes y de uso clínico son la acarbosa y el miglitol, sin embargo, es posible que provoquen efectos secundarios, tales como dolor abdominal, diarrea, flatulencias e incluso hipersensibilidad cutánea, es por eso, que se buscan opciones naturales para evitar los efectos secundarios.

CONCLUSIONES

En el estudio se logró comprobar que la semilla de *Morinda citrifolia* actúa como inhibidor natural de α -glucosidasa, por lo que es una opción viable para controlar la hiperglucemia.

También se comprobó la inocuidad de la semilla pues no presenta ninguna actividad tóxica; en cambio cuenta con un gran número de metabolitos secundarios, los cuales combaten los radicales libres y evitan la oxidación celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta M., (2003). Manejo ecológico del cultivo de noni, Panamá. Instituto de investigación agropecuario de panamá agencia española de cooperación internacional.
2. Chan-Blanco, Y., Reynes, M, et al., (2005). The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties, Costa Rica.
3. Farine, J.P., Legal, L., Moreteau, B., Le Quere, J.L., (1996.). Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry* 41, 433–438. +
4. García, C., Pérez, B., Martínez, A., Castro, F. (2009). Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes, *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 2009 8:229-239.
5. Izquierdo Orestes S. S., López Hernández D. García, C. M., González M.L, (2009). Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de hojas de *Morinda citrifolia*. *Rev. Cubana Plant. Med.* Vol.14, Numero 2 Ciudad de La Habana de Abril-Junio pp 1-
6. Leos-Rivas, C., Rivas-Morales, C., & García-Hernández, D. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.
7. Organización Mundial de la Salud, Informe mundial sobre la diabetes, (2016). Ginebra. Resumen de Orientación pp 1-4.
8. Ortiz-Martínez, D.M., Cordero-Pérez, P., & Leos-Rivas, C. (2016). Actividad antidiabética. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: Omnia Science. 215-268.
9. Silva, B. Y. (2005). Identificación de los componentes que presentan actividad antimicrobiana y citotóxica de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 12-55.
10. Torres, A., Toranzo, A., (2004). Antecedentes y estado actual de investigaciones sobre la utilidad médica de La *Morinda Citrifolia* (Noni Tahitiano). *Corr. Med. Cient. Holg.* Vol.13. Numero 4. pp.7-8.
11. Ulloa, J.A., Ulloa, P.R., Ramírez J.C., Ulloa B.E., (2012). El noni: propiedades, usos y aplicaciones potenciales, Nayarit, México, pp 44-5., *Revista Fuente Año 4 No. 10:* 44-59, ISSN 2007 – 0713.
12. Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: Omnia Science. 26-34.
13. Zar, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis* 3rd Edition, Prentice Hall, Englewood New Jersey, 662 p 150-155.

REMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA DEL RÍO TURBIO MEDIANTE HUMEDALES ARTIFICIALES

H. Baltazar Campos, D. Orona Tamayo, E. Kato Miranda y J.A. Arcibar Orozco*.

C. CONACYT – CIATEC, A.C. Centro de innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas.
Omega #201, Col. Industrial Delta, C.P. 3754 León Gto, México.

* jarcibar@ciatec.mx

RESUMEN

El Río Turbio es un cuerpo receptor de aguas domésticas y residuales del sector industrial del municipio de León, Guanajuato, principalmente el curtido. De acuerdo a un estudio de CONAGUA [1], su índice de calidad de agua lleva 10 años siendo catalogado como “fuertemente contaminado”. Una problemática muy local en el municipio de León y en el río se debe a la presencia de compuestos azufrados, mayormente sulfuros y sulfatos. La transformación bioquímica más importante de estos compuestos por su alto impacto ambiental y a la salud es la reducción del sulfato (SO_4^{2-}) para producir ácido sulfhídrico (H_2S). El H_2S es un gas altamente corrosivo y tóxico que se produce de forma natural debido a la descomposición anaerobia de la materia orgánica que contiene azufre, así como de la reducción bacteriana anaeróbica de sulfatos [2]. Entre los problemas que acarrea el H_2S están los efectos adversos en el sistema respiratorio, neurológico y la muerte. Además, se comporta como una fitotoxina para la vegetación, deteriorando su crecimiento e inhibiendo su reproducción. El H_2S liberado se acumula en el concreto y las tuberías de las industrias dañando su estructura, al oxidarse y combinarse con agua forma ácido sulfúrico que acidifica progresivamente, provocando así la formación de fisuras y picaduras en las estructuras [3].

El motivo de esta investigación es reducir el impacto ambiental que la actividad industrial ha provocado en el agua del Río Turbio. Para esto se propone el uso de humedales artificiales, los cuales tienen el potencial de ser aplicados en zonas de entarquinamiento y representar alternativas viables, ambientalmente económicas y eficientes de mitigación ambiental. Los humedales artificiales son espacios sinérgicos que se compone de plantas, sustrato y microorganismos; con esta sinergia se procesan y transforman compuestos químicos y biológicos, ayudando a estabilizar los ecosistemas acuático-terrestres y depurando aguas contaminadas mediante procesos de sedimentación, absorción, adsorción y metabolismo bacteriano [4]. En el caso particular del Río Turbio, un humedal podrá incrementar simultáneamente: la oxigenación del agua promoviendo procesos de sulfatoxidación, secuestro de metales pesados y disminución de DQO.

Para llevar a cabo el proceso, se fabricó y operó un humedal a nivel laboratorio, que consiste en recipientes de plástico de 25 L, piedra tezontle como sustrato y medio filtrante. Los humedales fueron plantados con especies nativas de la zona, tal como *Typha spp.* Se monitoreó los siguientes parámetros del agua: concentración de sulfatos, sulfuros, compuestos nitrogenados, DQO, pH, $T(^{\circ}\text{C})$, turbiedad y cromo. Adicionalmente se llevó a cabo una caracterización de las plantas para determinar la posible acumulación de elementos de origen contaminante. Los resultados indican que, en un periodo de 5 días, fue posible disminuir en un 70% la concentración de DQO, e incrementar la concentración de sulfatos. Actualmente se analiza la especiación del agua para determinar posibles mecanismos de transformación y acumulación de contaminantes. El presente proyecto representa una excelente alternativa con un enorme potencial de escalamiento para llevar a cabo una remediación integral de la cuenca del Río Turbio, después de más de 40 años de impacto ambiental.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua mantiene una estrecha relación con el crecimiento económico y poblacional; indudablemente, el incremento en estas actividades provoca una serie de impactos negativos, particularmente en la calidad de las aguas superficiales. Son las actividades urbanas, rurales y principalmente las industriales quienes generan fuertes cantidades de residuos contaminantes que posteriormente son descargados en los ríos. Según la UNESCO, el 80% de las aguas residuales que se generan son vertidas a estos ecosistemas sin recibir un tratamiento o

reutilización [5]. En la actualidad, el deterioro de los cuerpos de agua superficiales utilizados como receptores de sustancias contaminantes, merma la disponibilidad de su uso y trae consigo un riesgo global sobre la mala calidad del agua y un estrés hídrico. Es bajo esa premisa que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que para el 2025, la mitad de la población mundial vivirá en zonas de escasez de agua [6].

Normalmente, las aguas residuales descargadas en los ríos son de composición variada, ya que han sido sometidas a un proceso o alteración que modificaron sus propiedades físicas y químicas [7]. La complejidad para determinar la calidad del agua o bien su nivel de contaminación, así como los parámetros necesarios para su monitoreo dependerá del tipo de agua que recibe y el uso para el que está destinada. Uno de los indicadores más difundidos, es el índice de calidad del agua (ICA), mismo que ha sido adoptado y modificado por muchos países para su uso específico.

El ICA es una herramienta matemática que permite identificar la calidad de agua de un cuerpo superficial o de cualquier otro origen. El cálculo incorpora los parámetros físicos, químicos y biológicos que mejor representen al sitio de estudio y el objetivo de la investigación [8]. Para el cálculo se emplea una ecuación de tipo aditivo ponderada, donde cada parámetro seleccionado posee un cierto peso o ponderación (W_i) que dependerá de su importancia en el estudio. El resultado de esta evaluación expresa el porcentaje de contaminación del cuerpo de agua; aguas altamente contaminadas tendrán un ICA cercano o igual al 0% y aguas en buenas condiciones será cercano o igual a 100% [9].

En México, se ha reportado que aproximadamente el 70% de los cuerpos de agua superficiales exhiben síntomas de contaminación considerable [5]. Según un estudio, en el país se generan alrededor de 443.76 m³/s de aguas residuales y solamente se trata el 49%, el resto termina siendo liberado en cuerpos superficiales, principalmente ríos [5]. Un ejemplo sobresaliente de cuerpo natural receptor de efluentes industriales es el río Turbio, que está ubicado en la ciudad de León, Guanajuato. A través de los años se ha convertido en un colector de aguas residuales de los 43 sitios industriales que atraviesa. Tal es su nivel de contaminación, que la CONAGUA lo ha catalogado, durante más de 10 años, como un cuerpo de agua en estado fuertemente contaminado [10][1].

El municipio de León es ampliamente conocido por su intensa actividad industrial en el sector del cuero y calzado. Una problemática muy local por las empresas curtidoras que se concentran en parques industriales. Ese es el caso del Parque Industrial de León; la mayoría de las industrias instaladas se dedican al curtido de piel y algunas de ellas tienen descarga directa de efluentes contaminados al río Turbio. Se sabe que la industria del curtido produce aproximadamente 50 m³ de agua residual por cada tonelada de piel tratada [11]. Estas descargas están fuertemente concentradas con sulfuros y sulfatos, además de otros contaminantes tales como materia orgánica, cromo, amonio, NaCl y efluentes de pH variado. Diversos estudios han reportado que los valores de estos parámetros en una descarga de agua residual de curtiduría pueden encontrarse entre 300-400 mg⁻¹ para sulfatos, 5000 a 10000 mg⁻¹ para sulfuros, 3000-15000 mg⁻¹ para DQO, 1500-4000 mg⁻¹ para cromo y 500-3000 mg⁻¹ para amonio [12][13][14]. Un problema muy particular en este cuerpo de agua es la contaminación con compuestos de azufre tales como sulfatos (SO₄²⁻) y sulfuros (S²⁻). El azufre al ser un elemento con un amplio rango de estados de oxidación suele participar en muchos procesos redox mediados por microorganismos y ciertas características del medio. En el río Turbio, son estas características las que están promoviendo un ambiente en el que los compuestos del azufre se están transformando en ácido sulfhídrico (H₂S) [15].

El H₂S es un gas altamente corrosivo y tóxico [16]. Es un producto de la descomposición anaerobia de la materia orgánica que contiene azufre, así como de la reducción bacteriana anaeróbica de sulfatos. Este gas es liberado a la atmósfera donde persiste, desde un día en temporadas cálidas, hasta 42 días en temporadas frías, siempre y cuando el medio acuoso donde se encuentra tenga un pH menor a 6 [17]. Se ha reportado que la exposición a concentraciones altas de H₂S por inhalación, lo convierte en una sustancia letal para la salud poblacional y la fauna del entorno, ya que causa efectos adversos en el sistema respiratorio, neurológico y en algunos casos la muerte [15][17]. Además, se comporta como una fitotoxina para la vegetación pues provoca lesiones necróticas a las hojas, deterioro del crecimiento, inhibe la reproducción y modifica su morfología [3]. El H₂S liberado

se acumula en el concreto y las tuberías de las industrias dañando su estructura, al oxidarse y combinarse con agua forma puede formar ácido sulfúrico que corroe, provocando así la formación de fisuras y picaduras en las estructuras

Existen algunos tratamientos utilizados para remover sulfuros en agua. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que, al hablar de un cuerpo superficial, los volúmenes de agua a tratar son elevados. Una tecnología no convencional que tiene mucho potencial para el tratamiento de agua superficial y además combina la remoción de sulfuros y los grandes volúmenes de agua son los humedales artificiales (HA) [18][19].

Los humedales artificiales son un tratamiento natural para aguas contaminadas que, a través de procesos físicos, químicos y biológicos mediados por la acción de las plantas, el sustrato y los microorganismos, logran disminuir, degradar y transformar contaminantes presentes en el agua. Estos sistemas de ingeniería ecológica se utilizan debido a su alta eficiencia de remoción y costos relativamente bajos tanto de construcción como de mantenimiento [20]. Hay casos documentados donde se han empleado humedales para tratar agua residual con diversos contaminantes, incluyendo: compuestos azufrados [21], metales pesados [22], nutrientes [23], cromo [24], arsénico [25], de granjas porcícolas [26], entre otros. Al ser el Río Turbio un efluente con bajas tasas de oxigenación, con una considerable actividad reductora por parte de los microorganismos y poseer altas cantidades de sulfatos y sulfuros; el mecanismo de los humedales puede beneficiar en la degradación, estabilización y transformación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Además, tienen la capacidad que pueden suministrar oxígeno al medio a través de la actividad fotosintética de las plantas y de proliferar bacterias que favorezcan las reacciones de oxidación de compuestos reducidos del azufre [27][28].

En el presente estudio se diseñó y construyó un sistema de HA a escala laboratorio usando *Typha spp.* soportada con tezontle [29]. Se estudió su potencial para disminuir la concentración de sulfuro y el incremento en el índice de calidad del agua adaptado de la CONAGUA [10] y la National Sanitation Foundation [30]. Los humedales se alimentaron con agua del Río Turbio diluida en una relación 1:1 con agua del grifo. Se consideran como variables para el funcionamiento efectivo el tipo de planta, la concentración contaminada de agua y el tiempo de retención hidráulica (TRH). Se espera que los resultados obtenidos en este estudio puedan proporcionar las bases o criterios para su aplicación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las descargas por parte de la industria curtidora, liberan en el río Turbio compuestos azufrados y otros contaminantes en concentraciones tales que afectan la calidad de vida de la población, la fauna, la vegetación y al sector industrial. La carga contaminante ha sido tan extensa en términos de concentración y tiempo, que el río ha perdido la capacidad de autodepuración [31].

Son las reacciones por parte de los compuestos azufrados mediadas por la actividad de los microorganismos reductores de sulfato, y la suma de otras condiciones potenciadas por la alta carga de materia orgánica, la variabilidad en el pH y el ambiente anóxico, lo que está provocando la emisión de compuestos volátiles tóxicos en el aire, como el sulfuro de hidrógeno [32]. Es decir, los compuestos azufrados normalmente llegan al río en forma de sulfuros que es la forma más reducida del azufre y en forma de sulfatos que es la más oxidada. Se ha determinado que la cantidad de oxígeno en esta zona del río Turbio es muy nula por lo que la mayoría de las reacciones químicas que hay en el río son de reducción [33]. Dicho esto, al no haber oxígeno o algún otro aceptor de electrones, el sulfato es reducido hasta sulfuros por acción de los microorganismos para poder realizar sus actividades metabólicas. Los sulfuros, a diferencia de los sulfatos, son menos solubles, su solubilidad y forma depende del pH. Cuando el pH del río baja a 6 estos sulfuros se convierten en ácido sulfhídrico, mismo que es emitido en forma de gas a los alrededores del río [21][32]. No obstante, en condiciones con agua bien aireada, el sulfuro de hidrógeno se oxida fácilmente a sulfatos y posteriormente se oxida biológicamente a azufre elemental, completando el ciclo del azufre y disminuyendo el impacto ambiental [2].

Es evidente que la remoción de estos contaminantes debe ser prioridad para que se pueda mejorar tanto la calidad del agua como la vida de las personas. Sin embargo, es un problema complejo ya

que no solo existen compuestos azufrados, también otros contaminantes como materia orgánica, cromo, compuestos nitrogenados, pH irregular, metales pesados, etc. [34]. Por lo tanto, el presente proyecto incluye un estudio cuyo propósito es producir condiciones contrarias a las que ocurren actualmente en el río mediante el uso de humedales artificiales. Se espera que estos proporcionen un mecanismo de aireación por acción de las plantas, y de oxidación por los microorganismos, lo que propiciará las condiciones necesarias para oxidar los sulfuros en el agua y evitar su emisión.

JUSTIFICACIÓN

El motivo de esta investigación es reducir el impacto ambiental que la actividad industrial ha provocado en el agua del Río Turbio. León, Guanajuato al ser un municipio con pocos cuerpos de agua naturales y una marcada escasez hídrica, requiere que sus fuentes de abastecimiento naturales puedan ser aprovechadas y a su vez disminuir el impacto ambiental que los contaminantes provocan en el ambiente. Si bien la finalidad de tratar el agua del Río Turbio es una propuesta válida, no es un trabajo fácil. Los volúmenes de agua que acarrea un río son muy grandes para que una planta de tratamiento convencional pueda soportarlos, eso sin tomar en cuenta la costosa inversión que esto demandaría tanto en la construcción, operación y mantenimiento. Esta situación obliga a plantear alternativas para tratar el agua que fluye en el río. Para ello se propone el uso de humedales artificiales. Esta ecotecnología se vuelve ideal ya que representa costos de construcción y operación muy por debajo de otros sistemas de tratamiento de agua. Tienen la capacidad de soportar grandes volúmenes de agua y generar pocos lodos residuales, además de que representa una alternativa verde para el tratamiento de efluentes.

Adicionalmente, la zona de estudio exhibe características ideales para la implementación de un humedal como lo es el amplio espacio terrestre y que el sitio se identifica como zonas de entarquinamiento [35] por lo que se vuelve una zona ideal para la implantación del proyecto. Debido a la sinergia formada por los elementos que componen a esta tecnología, se vuelve un atractivo potencial para implementar en el tratamiento del agua del Río Turbio ya que promoverá fenómenos como el incremento de la oxigenación en el agua, lo que favorecerá la oxidación de algunos elementos, promoverá las reacciones de sulfatoxidación, el acomplejamiento o precipitación de metales y la disminución de la carga orgánica.

HIPÓTESIS

Si se utiliza un sistema de humedales artificiales subsuperficial plantado con *Typha spp*, entonces se puede disminuir la concentración de compuestos sulfurosos y a su vez aumentar el índice de calidad del agua del río Turbio, debido a los procesos de oxigenación y remoción mediados por las plantas y los microorganismos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de uso de humedales artificiales como una herramienta para reducir los compuestos sulfurosos y aumentar la calidad del agua del río Turbio, comparando el desempeño de diferentes tipos de plantas en la remoción de los contaminantes del sistema.

METODOLOGÍA PARA RESOLVER EL PROBLEMA

Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se empleó agua desionizada con una conductividad menor a 0.217 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en todos los experimentos. El agua que se analizó se obtuvo directamente del río Turbio. El punto de muestreo seleccionado para el estudio se localizó en la comunidad de San Roque, Gto, México. Las especies vegetales se recopilaron en diversos puntos sobre el perímetro del río que se mencionan en el apartado de Muestreo y recolección. El Sistema de humedales, en específico, son de elaboración propia y se especifican sus características en el apartado de Experimentación de los humedales.

Muestreo y recolección

Se realizó un muestreo preliminar para la recolección de especies vegetales que fueran acuáticas, endémicas y emergentes en sitios ubicados sobre el perímetro del río. Se visitaron cinco zonas de muestreo ubicadas en los puntos 21°00'27.3"N 101°48'14.9"W, 21°00'59.7"N 101°49'07.4"W, 21°03'59.6"N 101°43'39.2"W, 21°03'59.4"N 101°43'39.5"W, 21°04'47.9"N 101°42'37.7"W en el tramo desde Santa Rosa Plan de Ayala, hasta la cercanía a la comunidad de San Roque de Montes, Guanajuato. Se aseguró un procedimiento adecuado sobre las técnicas de recolección y preservación de las especies. Una vez recolectadas se colocaron en los reactores donde se mantuvieron durante 15 días bajo fotoperíodo natural y temperatura ambiente para ver su respuesta ante el tratamiento. Posteriormente se hizo una recolección de agua en la zona 21°00'59.7"N 101°49'07.4"W con base en los lineamientos de la NMX-AA-003-1980 y el Standard Methods of Water and Wastewater. Se seleccionó esta región geográfica como la más adecuada pues el agua ya presenta cierto grado de homogenización y son zonas identificadas de entarquinamiento. En campo, bajo las condiciones climatológicas se midió el pH, la temperatura y la CE con base en las normas NMX-AA-008-SCFI-2016, NMX-AA-007-SCFI-2000 y NMX-AA-093-SCFI-2000, respectivamente.

Experimentación en los humedales

Se construyó un sistema de humedales artificiales (HA) independientes en tanques de polietileno de 25 L de capacidad. Los reactores fueron alimentados a través de un sistema de tuberías de CPVC de ½ pulgada, que está conectada a un tanque de almacenamiento principal de 120 L de capacidad. Los humedales se empacaron con tezontle como material de sustrato. Los reactores se colocaron en un invernadero que se diseñó con paredes de plástico y techo de malla semitransparente con suficiente entrada de luz y aire. Los puntos de muestreo se colocaron al extremo contrario de la entrada del flujo. Se instaló una llave esfera a una altura de 9 cm de la superficie del suelo en cada reactor.

Los humedales se alimentaron con una mezcla de agua del río Turbio con agua de grifo 1:1 a través del tanque de almacenamiento. Posteriormente se hizo un seguimiento de la concentración de los contaminantes y del ICA utilizando cuatro réplicas (H1, H2, H3, H4) plantadas con la especie vegetal seleccionada y un blanco (sin tezontle, únicamente agua) (H5). Los humedales se monitorearon durante cinco días. Las muestras de agua se tomaron todos los días a la misma hora y para el caso del pH, la conductividad eléctrica y la temperatura se hará tanto en el día como en la noche y cada muestra se analizó por triplicado para fines de seguridad.

Determinación de los parámetros de la calidad del agua

El agua se caracterizó para determinar su DQO en base al método establecido por la NMX-AA-030/2-SCFI-2011 por el método dicromato de potasio. El contenido de sulfatos, nitratos, cloruros y amonio determinó por análisis cromatográfico en un equipo Dionex ICS-5000+ de Thermo Scientific. La concentración de sulfuros se determinó según la NMX-AA-084-SCFI-2005 por la técnica del método iodométrico. La determinación de cromo se determinará mediante espectrofotometría de absorción atómica por llama en ICE 3000 de Thermo Scientist, después de una digestión ácida con HNO₃. Las mediciones de pH, CE y temperatura se realizaron con un multímetro portátil marca HACH sension6. El electrodo se calibró antes de cada medición usando soluciones amortiguadoras de pH 4, pH 7 y pH 10.

En las plantas se analizó el contenido orgánico (C, H, N y S) utilizando un analizador elemental Flash 2000 de Thermo Scientist. Se determinó la concentración de cromo mediante espectrofotometría de absorción atómica por llama e ICE 3000 de Thermo Scientist, después de una digestión ácida con HNO₃. Se evaluó las tasas de crecimiento de las plantas analizando la altura de la planta, el número de brotes y área foliar. Para ello la altura de la planta se expresó como la suma de las alturas de las plantas de un reactor y se promedió. El área foliar se determinará midiendo y multiplicando el largo por el ancho de cada hoja y el resultado se deberá multiplicar por un factor de 0.75, se sumarán los valores obtenidos de cada hoja por planta para promediar los valores de un reactor.

Análisis de datos

Para realizar una medida homogénea de la calidad del agua se utilizó como herramienta el ICA. Para lo cual se definieron los parámetros que se emplearon en la ecuación, donde cada parámetro recibió un peso o ponderación (W_i). Los parámetros seleccionados para indicar el ICA del tratamiento se eligieron con base al objetivo del proyecto: Demanda Química de Oxígeno (DQO), sulfuros, sulfatos, nitratos, amonio, cloruros, cromo, pH, conductividad eléctrica y turbiedad.

Las ecuaciones utilizadas para determinar el ICA [3]:

$$W_i = \frac{w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde: W_i es el peso relativo; w_i es el peso de cada parámetro; n es el número de parámetros.

$$q_i = \left(\frac{C_i}{S_i} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde: q_i es la calificación de calidad; C_i es la concentración de cada parámetro químico en cada muestra de agua en mg / l; S_i es el valor de la línea guía / límite deseable

$$S_i = W_i * q_i$$

$$WQI = \sum S_{i-n} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde: S_i es el subíndice del parámetro i -ésimo; W_i es el peso relativo del i -ésimo parámetro; q_i es la clasificación basada en la concentración de i -ésimo parámetro y n es el número de parámetros.

En la Tabla 1 se muestran los valores para determinar el ICA estarán comprendidos en la siguiente escala:

Tabla 1. Valores ICA para la evaluación de cuerpos de agua [36][37]

Valor ICA	Clasificación	Color
90-100	Excelente	Azul
70-90	Buena Calidad	Verde
50-70	Aceptable	Amarillo
25-50	Contaminada	Naranja
0-25	Fuertemente contaminada	Rojo.

Para determinar si había un efecto de cada tratamiento se realizó un análisis de varianza por medio del programa MINITAB. El análisis de significancia se corroboró mediante el uso de la prueba p -value y una prueba Tukey para la comparación entre grupos. Fue relevante pues se necesitaba lograr que las réplicas de los humedales no mostraran una diferencia significativa entre ellas. Sin embargo, era importante que sí se lograra notar una diferencia significativa entre su comportamiento día con día en comparación con el blanco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema de humedales artificiales se puede observar en la Figura 1. Los humedales se diseñaron del tipo subsuperficial ya que facilitan el uso de plantas emergentes, evita la formación de insectos (proliferación de mosquitos), malos olores y favorecen la aireación del sistema. La especie de vegetación emergente que se utilizó para la experimentación fue *Typha spp*, ambas provenientes del río Turbio. Esta especie se seleccionó debido a que al ser recolectada del mismo río posee un alto grado de adaptación a la contaminación del río, además, se ha reportado que son plantas muy utilizadas en humedales por su capacidad de resistir condiciones con alta carga de materia orgánica y concentraciones de metales pesados. El tezontle como sustrato se eligió por ser un material inerte con un alto índice de porosidad, ser de bajo costo y que abunda en el estado de Guanajuato, su estructura favorece la formación de películas bacterianas, los procesos de adsorción, la aireación y el flujo del agua. Tiene un alto porcentaje de hierro en su composición lo que beneficiará el proceso de remoción del sulfuro. Con el invernadero se buscó proteger las plantas sin evitar que tuvieran una buena aireación y entrada de luz, así se mantuvieron las condiciones similares a una aplicación real.



Figura 1. Humedales artificiales a nivel laboratorio.

En el muestreo preliminar se recolectaron cinco plantas, tres de ellas acuáticas y dos tomadas de la interfaz suelo-agua. Algunas de ellas se encontraban en la periferia del río y otras en ramificaciones de éste. Las plantas recolectadas se identifican en la Figura 2.

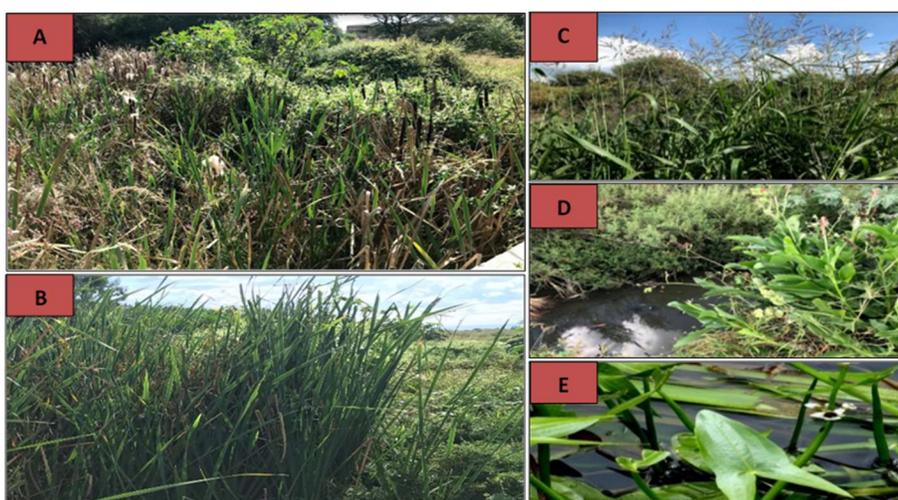


Figura 2. Fotografías de las especies vegetales recolectadas en el muestreo (A) *Typha domingensis*, (B) *Schoenoplectus acutus*, (C) *Panicum repens*, (D) *Canna indica*, (E) *Sagittaria sagittifolia*.

Tras el periodo de aclimatación y evaluación de las cinco plantas recolectadas, únicamente logró sobrevivir *Typha spp*, por lo que se decidió utilizarla para esta investigación. Cabe resaltar que esta planta crece en contacto directo con el agua del río, lo que nos indicó que una previa adaptación genera mecanismos de tolerancia para que la plantas soporte agua con características propias del sitio. En la Tabla 2 se muestra la caracterización para *Typha spp*.

Tabla 2. Caracterización de *Typha spp* del Río Turbio.

Parámetro	Valor	
	Raíz	Hoja
C	23.67	34.53
H	3.26	4.75
N	1.13	1.63
S	0.34	1.01
Cromo	----	
Altura de planta	35 cm	
N° de brotes	4	

Se caracterizó el agua del Río Turbio que se recolectó en la localidad de San Roque de Montes, Guanajuato. Las determinaciones realizadas son las seleccionadas para evaluar el índice de calidad del agua. En la Tabla 3 se muestra la caracterización parcial del agua del Río Turbio.

Tabla 3. Caracterización de agua del Río Turbio.

Parámetro	Valor
DQO	7142.86 mgL ⁻¹
Sulfuros	-----
Sulfatos	476.02 mgL ⁻¹
Nitrato	0 mg ^{-L}
Cloruros	1211.16 mgL ⁻¹
Amonio	----
Turbiedad	----
Cromo	----
pH	8.12
CE	6.57 mScm ⁻¹
DQO mezcla 1:1	5031.20 mgL ⁻¹

Según las determinaciones, la concentración de la DQO disminuye hasta en un 71% en todos los humedales conforme avanzan los cinco días de TRH en comparación con el blanco, del que solo se presenta una variación de un 4.5% con base en el valor del día 0 (Figura 3.A). Mediante una prueba *p-value* y una prueba de Tukey, los resultados demostraron que entre los humedales (H1, H2, H3, H4) no hay una diferencia significativa en su comportamiento, es decir la permutación de los arreglos y las diferencias por microambientes desarrollados en cada reactor no son significativas, comparado con su capacidad de remover materia orgánica. Adicionalmente, la remoción de DQO alcanza una asíntota después de los 5 días, donde al parecer se alcanza un sistema estable y probablemente un máximo de remoción del 70% (Figura 3.B). La cantidad de materia orgánica residual en los reactores después de 4 días corresponderá con la necesaria para mantener el ecosistema.

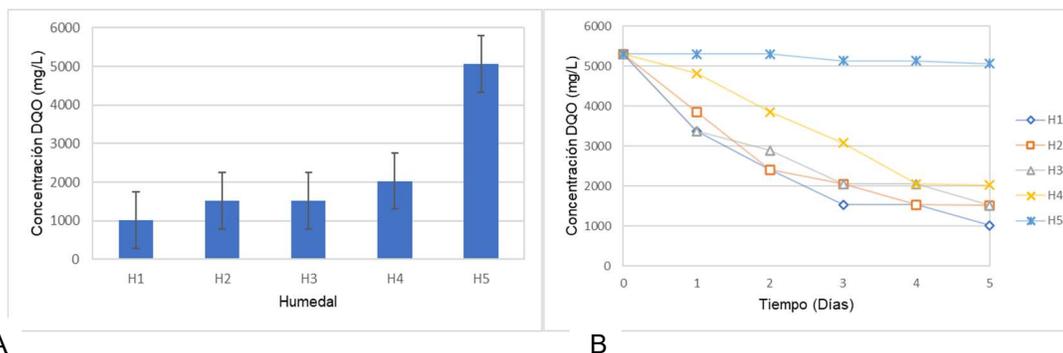


Figura 3. (A) Concentración final de la DQO en los humedales en el día 5. (B) Evolución de la DQO en los humedales durante 5 días.

Existió una mayor variación respecto a la evolución del sulfato con respecto al tiempo en los humedales y dada la gran movilidad de este elemento, una mayor variación entre humedales. Indicando que para la remoción de sulfato existen factores relacionados con microambientes que controlan su movilidad (Figura 4.A). Dicho esto, un análisis ANOVA indicó que existe una diferencia significativa del grupo de los humedales con respecto al blanco y que la tendencia después de los 5 días fue ligeramente al aumento, lo cual sugiere la oxidación del azufre por los humedales. Después de 5 días, la concentración de sulfato fue desde un 40% hasta un 53% mayor que el blanco, dependiendo el humedal (Figura 4.B).

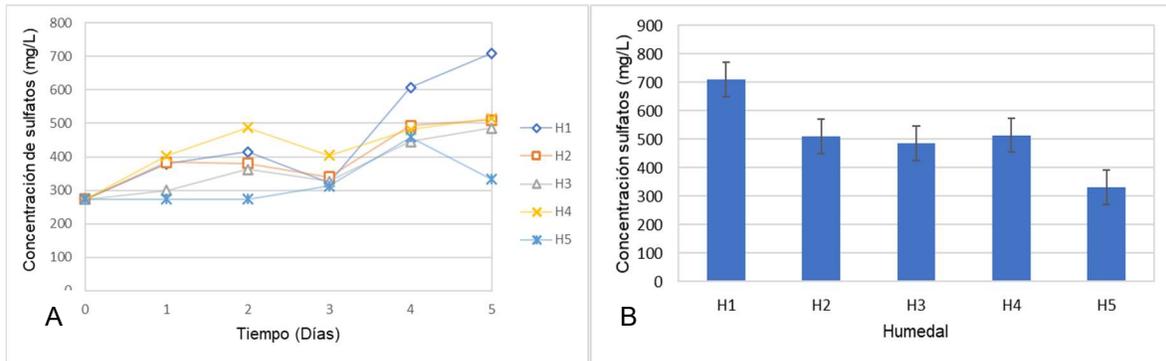


Figura 4. (A) Evolución del sulfato en los humedales durante 5 días. (B) Concentración final de sulfatos en los humedales en el día 5.

La medición del pH en los humedales demostró que el pH se comporta diferente en el día y la noche y, en cualquier caso, 1.2 unidades de pH menor en comparación con el blanco. El análisis demostró que entre el pH del humedal y el blanco sí existe una diferencia significativa. Por otro lado, el monitoreo de la temperatura demostró que no existe una diferencia significativa entre la temperatura de los tratamientos, pero si con relación al blanco. Los humedales siempre mantuvieron una temperatura mayor que el blanco en aproximadamente 3 °C. El análisis de la conductividad en los tratamientos demostró que la influencia de las plantas no provoca una diferencia significativa sobre la conductividad del agua de salida. Figura 5.

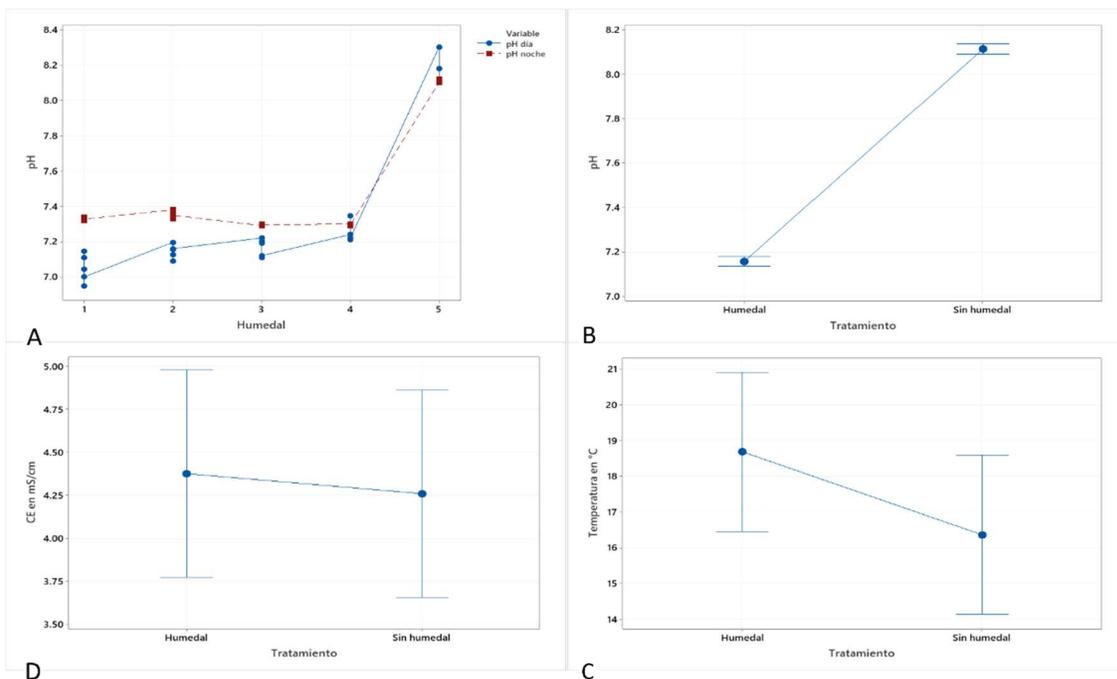


Figura 5. (A) Evolución del pH en los humedales durante 5 días (B) Efecto del pH con humedal y sin humedal (C) Efecto de la temperatura con humedal y sin humedal (D) Efecto de la CE con humedal y sin humedal.

Según los resultados obtenidos por el análisis de varianza, se puede inferir que las réplicas de los humedales trabajan en sintonía, es decir que pueden ser replicados, una prueba Tukey y *p-value* mostraron que entre ellos no hay diferencias significativas. La disminución de la DQO de hasta un 70% en los cuatro humedales demuestra que sí hay una influencia por parte de sus componentes en comparación con el blanco. Es probable que la disminución de la materia orgánica se haya llevado a cabo por la actividad metabólica de bacterias que proliferaron. El desarrollo de estos microorganismos está bastante ligado a las condiciones del medio, tales como pH y temperatura. Se ha reportado [38] que microorganismos degradadores de materia orgánica se desarrollan bajo condiciones de pH 5 a 9 y temperatura de 15 a 28 °C por lo que las condiciones monitoreadas durante los cinco días son ideales para el crecimiento de estos microorganismos. Además, de que el sustrato y las raíces de las plantas son la superficie perfecta para formar biopelículas activas, cosa que no sucedió en el blanco.

El pH del blanco durante el monitoreo se mostró fijo en un valor cercano a 8. El pH de los humedales durante el muestreo nocturno alcanza su punto más alto debido al proceso de fotosíntesis durante el día. Al amanecer, en el muestreo matutino se puede observar que el pH del agua llega a su punto más bajo debido al fenómeno de respiración de las plantas durante la noche. Un fenómeno similar pasa con la temperatura, durante la noche la temperatura del humedal disminuye y por el día aumenta. Sin embargo, los humedales normalmente se mostraron algunos grados más arriba que el blanco y esto se puede deber a la capacidad del tezontle para retener calor, ya que como recordaremos el humedal es de tipo subsuperficial, por lo que el sustrato es directamente incidido por la energía solar.

Un indicador importante en la investigación es la disminución en la concentración de sulfuros en el agua y un aumento a los sulfatos, es decir, favorecer las reacciones de oxidación. Los resultados de la evaluación durante los cinco días mostraron un aumento de sulfatos. El incremento de su concentración se liga directamente con las tasas de oxígeno suministrado por el proceso de fotosíntesis llevado a cabo por las plantas. No puede ser por re-aireación ya que este es un proceso en el que el oxígeno del aire se disuelve en la superficie del agua, principalmente a través de las turbulencias, limitado al ser un reactor subsuperficial. A pesar de que el aumento de sulfatos era la intención, el incremento no fue el esperado. Creemos que esto se puede deber a lo siguiente, al haber sido días muy nublados, como se puede ver reflejado en la temperatura monitoreada, es posible que las tasas fotosintéticas se hayan reducido debido a una baja en la intensidad de luz proporcionada para excitar el proceso, lo que se traduce en menos oxígeno disponible. Por otro lado, el muestreo de este parámetro se realizó en un horario matutino. Al amanecer el agua posee menos concentración de oxígeno debido al proceso de respiración de las plantas durante la noche por lo tanto se desfavorecen las reacciones de oxidación. Y por último también se debe contemplar que pueda estar siendo adsorbido por el sustrato o las plantas. Es importante mencionar que el hecho de que las concentraciones de sulfatos no hayan disminuido es muy importante pues podría expresar que al menos esos aniones no se están reduciendo a sulfuros.

En el monitoreo diario sobre los valores de conductividad eléctrica, mostraron un ligero aumento en efluente de los humedales contra el blanco. Los valores medidos de conductividad eléctrica oscilaron entre 4 mScm⁻¹ y 5 mScm⁻¹ lo que no es extraño pues al ser agua que recibe descargas de las curtidurías, el cloruro de sodio es un contaminante común. Es posible que el ligero incremento esté relacionado con el aumento de iones en solución de los humedales. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el análisis demostró que la influencia de las plantas no provoca una diferencia significativa sobre el agua de salida. Respecto al índice de calidad del agua del influente y el efluente, la ecuación no pudo ser concluida pues son diez los parámetros necesarios para obtener un valor representativo para la investigación.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha reforzado la hipótesis que se planteó en el proyecto, donde la concentración de sulfatos aumentó en el agua una vez que ésta atravesó el sistema de humedales. Debido a la capacidad de plantas para proporcionar oxígeno al medio, se favorecen las reacciones de oxidación y se provee el necesario para los microorganismos con vías metabólicas aerobias. Adicionalmente, la remoción de la DQO se favorece debido a la sinergia que ocurre entre planta-microorganismo,

mostrando a los cinco días un posible punto de establecimiento y probablemente un máximo de remoción del 70% que corresponde a lo publicado en la literatura. Será importante determinar e indagar qué compuestos están utilizando las bacterias como aceptor o donador de electrones para llevar a cabo estas funciones. Una decisión significativa fue seleccionar plantas endémicas del río pues ya presentan cierto grado de adaptabilidad a las características del agua de estudio, tales como concentradas cargas orgánicas, metales pesados y cambios físicos. Será necesario realizar todas las determinaciones para lograr un entendimiento completo del sistema y concluir si es que es posible replicarlo y controlarlo en un ambiente *in situ* del Río Turbio. Para la continuación del trabajo queda por discutir qué es lo que pasa con los sulfuros dentro del mecanismo del humedal, se espera entender de manera concreta cómo es que están funcionando los reactores y quiénes están realizando la mayor parte del trabajo. Además, queda pendiente la resolución de la ecuación del índice de calidad del agua para determinar en qué porcentaje cambia el influente del efluente una vez que se somete al tratamiento. El resultado se decretará cuando se concluyan las pruebas para determinar parámetros faltantes como sulfuros, cromo, turbiedad y otros iones.

REFERENCIAS

1. CONAGUA, "Datos de calidad del agua de 5000 sitios de monitoreo de CONAGUA," Energía Y Medio Ambiente," Available: <https://www.gob.mx/conagua/documentos/monitoreo-de-la-calidad-del-agua-en-mexico>, 2017. Accesado el 9 de febrero de 2020.
2. M. Holmer y P. Storkholm, "Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review," *Freshw. Biol.*, vol. 46, no. 4, 2001, pp. 431–451.
3. M. Lisjak, T. Teklic, I. D. Wilson, M. Whiteman, and J. T. Hancock, "Hydrogen sulfide: Environmental factor or signalling molecule?," *Plant, Cell Environ.*, vol. 36, no. 9, 2013, pp. 1607–1616.
4. H. Wu et al., "A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation," *Bioresour. Technol.*, vol. 175, 2015, pp. 594–601.
5. CNDH, "Estudio sobre la protección de ríos, lagos y acuíferos desde la perspectiva de los derechos humanos", 2018, pp. 313.
6. OMS/UNICEF, "Drinkin water.," <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>, 2019. Accesado el 20 de mayo de 2020.
7. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, "Norma Oficial Mexicana. NOM-001-SEMARNAT-1996. Límites Máximos Permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.," D. Of. la Fed. 23 abril 2003, pp. 1–33.
8. D. Gupta, G. Singh, A. K. Patel, and V. Mishra, "An Assessment of Groundwater Quality of Varanasi District using Water Quality An Assessment of Groundwater Quality of Varanasi District using Water Quality Index and Multivariate Statistical Techniques," vol. 7112, no. May, 2019.
9. A. K. Batabyal and S. Chakraborty, "Hydrogeochemistry and Water Quality Index in the Assessment of Groundwater Quality for Drinking Uses," *Water Environ. Res.*, vol. 87, no. 7, 2015, pp. 607–617.
10. Conagua, "Monitoreo de la calidad del agua en México. De los sitios muestreados por la Red Nacional de Monitoreo del 2012-2015.," Com. Nac. del Agua, 2016, pp. 9.
11. A. Pati, R. Chaudhary, and S. Subramani, "A review on management of chrome-tanned leather shavings: a holistic paradigm to combat the environmental issues," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 21, no. 19, 2014, pp. 11266–11282.
12. B. I. Islam, A. E. Musa, E. H. Ibrahim, S. A. A. Sharafa, and B. M. Elfaki, "Evaluation and Characterization of Tannery Wastewater," *J. For. Prod. Ind.*, vol. 3, no. 3, 2014, pp. 2325–4513.
13. P. Religa, A. Kowalik, and P. Gierycz, "Application of nanofiltration for chromium concentration in the tannery wastewater," *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, no. 1, 2011, pp. 288–292.
14. S. Sundarapandiyam, R. Chandrasekar, B. Ramanaiah, S. Krishnan, and P. Saravanan, "Electrochemical oxidation and reuse of tannery saline wastewater," *J. Hazard. Mater.*, vol.

- 180, no. 1–3, 2010, pp. 197–203.
15. OMS, “Guías para la calidad del agua potable (Introducción),” *Organ. Mund. la Salud*, vol. 1, 2004, pp. 11–26.
 16. D. S. Drozd, “Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals”, *N.A. Sciences*, vol. 9, 2010, pp. 173.
 17. D. Quality, “pH in Drinking-water Background document for development of,” *pH Drink.*, vol. 2, 1996, pp. 7.
 18. A. Hernández and J. Moreno, “Tratamiento de aguas residuales industriales en México: Una aproximación a su situación actual y retos por atender.,” *RINDERESU*, 2017 pp. 14.
 19. A. R. Fernández-alba, “Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales,” *CEIM*, 2006, pp. 137.
 20. C. Arias and H. Brix, “Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales Abstract,” *Cienc. e Ing. n Neogranadina*, no. 13, , 2003, pp. 17–24.
 21. S. Wu, C. Jeschke, R. Dong, H. Paschke, P. Kuschk, and K. Knöller, “Sulfur transformations in pilot-scale constructed wetland treating high sulfate-containing contaminated groundwater: A stable isotope assessment,” *Water Res.*, vol. 45, no. 20, 2011, pp. 6688–6698.
 22. E. Osmá, V. İlhan, and İ. E. Yalçın, “Heavy metals accumulation causes toxicological effects in aquatic *Typha domingensis* Pers,” *Rev. Bras. Bot.*, vol. 37, no. 4, 2014, pp. 461–467.
 23. M. Gophen, “Nutrient and plant dynamics in Lake Agmon Wetlands (Hula Valley, Israel): A review with emphasis on *Typha domingensis* (1994-1999),” *Hydrobiologia*, vol. 441, no. 1948, 2000, pp. 25–36.
 24. V. A. Papaevangelou, G. D. Gikas, and V. A. Tsihrintzis, “Chromium removal from wastewater using HSF and VF pilot-scale constructed wetlands: Overall performance, and fate and distribution of this element within the wetland environment,” *Chemosphere*, vol. 168, 2017, pp. 716–730.
 25. C. Aragón and T. Herrera, “Arsenic retention in a wetland constructed with *Eleocharis macrostachya* and *Schoenoplectus americanus*,” *SciELO*, vol. 2, 2014.
 26. Gonzalo., J. Salazar, S. Hernandez, Marta, Arias, F. Bentancur, and Gomez, “Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas,” *Inf. Técnico*, vol. 74, no. 0, 2010, pp. 12–22.
 27. R. Vidyalakshmi, R. Paranthaman, and R. Bhakayaraj, “Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition-A Review,” *World J. Agric. Sci.*, vol. 5, no. 3, 2009, pp. 270–278.
 28. C. DuPoldt, R. Edwards, L. Garber, B. Isaacs, and J. Lapp, “A Handbook of Constructed Wetlands: General Considerations,” *Ecol. Eng.*, vol. 1, no. 1996, 1996, pp. 53.
 29. M. Martínez, “Manual para la identificación de Plantas Acuáticas Exóticas Invasoras en México” *IMTA*, 2018, pp. 63-65.
 30. M. Wills and K. N. Irvine, “Application of the National Sanitation Foundation Water Quality Index in the Cazenovia Creek, NY, Pilot Watershed Management Project,” *Middle States Geogr.*, 1996, pp. 95–104.
 31. E. Claudio, “La contaminación del río Turbio: retos para el manejo sostenible de la cuenca hidrológica Lerma-Chapala.,” Available: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=498.>, 2018. Accesado el 11 de marzo de 2020.
 32. CONAGUA, “Tecnologías Más Limpias en la Industria de la Curtiduría en la ciudad de León, Gto.,” 2014, pp. 1–41.
 33. J. Álvarez and J. Arcibar, “Estimación del nivel de contaminación del río turbio y propuestas de atenuación química del efecto de gases corrosivos.,” *CIATEC*, 2019, pp. 30.
 34. CPML, “Manual de Buenas Prácticas Ambientales para el Sector MIPYME - Tenerife,” vol. 1, 2008, pp. 15-19.
 35. O. González Santana, “El reto de la gestión del agua en las regiones de México ante los efectos del cambio climático: el caso de la cuenca del río Turbio,” *Cuad. Geogr. Rev. Colomb. Geogr.*, vol. 22, no. 2, 2013, pp. 125–144.
 36. M. A. T. Koçer and H. Sevgili, “Parameters selection for water quality index in the assessment of the environmental impacts of land-based trout farms,” *Ecol. Indic.*, vol. 36, 2014, pp. 672–

681.

37. M. Castro, J. Almeida, J. Ferrer, and D. Díaz, "Indicadores de la calidad del agua: evolución y tendencias a nivel global," *Ing. Solidar.*, vol. 10, no. 17, 2014, pp. 111–124.
38. A. Zárate and C. Durán-de-bazúa, "Remoción de contaminantes en un sistema modelo de humedales artificiales a escala de laboratorio," *Tecnol. Ciencia, Educ*, 2008, pp. 7.

PRODUCCIÓN DE 5-HIDROXIMETIL-2-FURFURALDEHÍDO (HMF) A PARTIR DE FRUCTOSA, GLUCOSA, ESTEVIA Y MANITOL CARACTERIZADO POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA, HPLC Y FT-IR

Camila Guisande Machado, Andrea Carolina Valero de la Cruz, Maricela González Leal, Víctor Pérez Moreno, Miguel Ángel Rico Rodríguez, Miguel Ángel Rea López y Adrián Sosa Domínguez.

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA), 76010, Querétaro, México.

adrian.adrisodo@gmail.com

RESUMEN

El compuesto 5-hidroximetilfurfural o 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF) es un producto intermediario estructurado por un anillo furánico, un aldehído y un alcohol de las reacciones de oscurecimiento no enzimáticas conocidas como reacción de Maillard y caramelización a partir de azúcares reductores¹. Es el producto formado por la descomposición térmica de los glúcidos. Se genera en los alimentos sometidos a tratamientos térmicos; sin embargo, también es posible su producción a bajas temperaturas y largos periodos de almacenamiento, por lo que es un buen indicador de su calidad. Entre otros factores que varían con el alimento es el tipo y la concentración del azúcar, así como su pH. El interés en el estudio del HMF se ha incrementado en los últimos años por las discusiones entre sus efectos positivos y negativos, como antioxidante, antiinflamatorio y antialérgico, y por otro lado su actividad genotóxica y mutagénica². El objetivo de este estudio fue determinar cualitativamente la presencia de HMF mediante las técnicas analíticas de voltamperometría cíclica, HPLC-DAD y FT-IR utilizando edulcorantes naturales y sintéticos (fructosa, glucosa, manitol y estevia) induciendo la reacción de Maillard con la presencia de L-Lisina en un medio de pH=4 y pH=10, a temperatura constante de 100°C durante 40 minutos. En las técnicas utilizadas para llevar a cabo la caracterización del HMF se analizaron por separado las matrices de las muestras para eliminar interferencias. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad para identificar el compuesto por la técnica de voltamperometría cíclica presentándose un pico anódico en un potencial cercano a -1.25 V. Por FT-IR se identificaron los grupos funcionales característicos de la molécula O-H, C=C y C=O y de forma menos precisa un tiempo de retención aproximado de 2.9 minutos con una longitud de onda de máxima absorción de 284 nm en HPLC. Los resultados obtenidos por las técnicas analíticas empleadas confirmaron la presencia de HMF en las muestras y mayor producción de este compuesto usando fructosa en medio ácido.

INTRODUCCIÓN

El 5-hidroximetil-2-furfuraldehído, también conocido como hidroximetilfurfural o HMF, es un aldehído furánico que se forma como intermediario de la reacción de Maillard o de caramelización a partir de azúcares reductores (o lípidos oxidados).

En la industria de los alimentos muchos de los procesos de preparación previo al consumo involucran tratamientos térmicos a altas temperaturas que favorecen la formación del HMF. Especialmente, la reacción de Maillard es considerada como la principal responsable de la transformación de las propiedades organolépticas de los alimentos durante estos procesos (incluso se puede llevar a cabo a bajas temperaturas o en largos periodos de almacenamiento) deteriorándolos. Esta reacción ocurre por la unión de un grupo carbonilo del azúcar reductor con un grupo amino libre, que además se ve influida por factores como los precursores, la temperatura, el tiempo, el pH y la humedad.

En este trabajo experimental se buscó inducir la reacción de Maillard a partir de edulcorantes tanto naturales como sintéticos (actualmente siendo más utilizados en la industria de los alimentos como reemplazo del azúcar) a una temperatura constante, durante un tiempo establecido y distintos pH con el objetivo de determinar cualitativamente la presencia de HMF.

Diversas fuentes de información afirman que el hidroximetilfurfural es potencialmente carcinógeno; sin embargo, hay estudios que demuestran que es antioxidante, antibiótico y antialérgico, por lo que es una necesidad de estudio la formación de la molécula para el ámbito de los alimentos y la industria.

TEORÍA

Reacción de Maillard

Los alimentos pueden sufrir cuatro tipos de reacciones de oscurecimiento: reacción de Maillard, caramelización, oxidación del ácido ascórbico y oscurecimiento por fenolasa. Siendo las primeras tres de forma no enzimática o químicas³ y de nuestro interés por su capacidad para modificar el color, sabor y olor de los alimentos a partir de los tratamientos térmicos a los que son sometidos durante su procesamiento como cocción, pasteurización, esterilización y deshidratación o simplemente por su almacenamiento⁴.

Las reacciones de oscurecimiento presentan ventajas al generar un alimento más atractivo para el consumidor gracias a ese color pardo, olor y sabor agradable, pero con la desventaja de alterar sus propiedades organolépticas y el valor nutricional del mismo. Es por esto por lo que la industria alimentaria busca establecer normas de procesado y control que disminuyan estas transformaciones⁴.

Especialmente, la reacción de Maillard ha sido reconocida a lo largo de los años como la primera ruta responsable de transformar las propiedades organolépticas de los alimentos sometidos a calentamiento y deteriorar los alimentos durante su proceso y almacenamiento. Por una parte, es el efecto protector de productos de la reacción que funcionan como antioxidantes y antimicrobianos, sin embargo, también forma sustancias perjudiciales como aminas heterocíclicas, furanos, HMF y acrilamida⁵.

La reacción de Maillard se lleva a cabo cuando un azúcar reductor (o un lípido oxidado) se combina con un grupo amino libre de aminoácidos, proteínas o péptidos en su cadena lateral a ciertas condiciones. Puede ser en un medio ácido o alcalino (preferentemente), en alimentos con humedad intermedia (0.6-0.85) o en solución acuosa y a altas temperaturas, aunque tiene la característica de poder ocurrir a bajas temperaturas cuando se almacenan los alimentos por un periodo largo de tiempo³.

La reacción de Maillard es dividida en 3 etapas comúnmente (Figura 1)^{5,4,6}.

I. Etapa inicial. Ocurre la condensación entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor (o incluso un compuesto carbonílico que se formó durante la etapa intermedia de la reacción de Maillard o de una oxidación lipídica) con un grupo amino libre ya sea de un aminoácido, péptido o proteína formándose una base de Schiff, esta última al ciclarse se transforma en la glicosilamina N-sustituida que corresponda, siendo más estables las glicosilaminas procedentes de aminas aromáticas que de aminoácidos. Esta reacción puede ser reversible cuando el medio es fuertemente ácido, ya que el azúcar y el aminoácido se regeneran. El grupo amino en la reacción actúa como catalizador haciéndola más rápida y formando mayores cantidades de productos intermedios muy reactivos, aunque también, en las reacciones de degradación de azúcares sin estos grupos amino como la caramelización se llega a productos similares.

Hay dos procesos que se pueden seguir dependiendo de que la base de Schiff es una aldósilamina N-sustituida o una cetósilamina-N-sustituida; en el primer caso, por la llamada reorganización de Amadori se forma la 1-amino-1-deoxi-2-cetosa, mientras que en el segundo caso por reorganización de Heyns se forma una 2-amino-2-deoxi-2-aldosa.

Durante esta etapa aún no hay pardeamiento.

II. Etapa avanzada. En esta etapa influyen en el camino que siguen los productos de Amadori y Heyns: pH, actividad de agua, presencia de metales divalentes y temperatura. Dependiendo de las condiciones, se forman compuestos intermedios que son responsables del aroma y del color de los alimentos cocinados.

Las glicosilaminas-N-sustituidas llevan a cabo una reorganización irreversible considerando que si es una aldósilamina-N-sustituida se lleva a cabo una transposición de Amadori generando 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, y una transposición de Heyns cuando se trata de una cetósilamina-N-sustituida a 2-amino-2-desoxi-2-aldosa.

III. Etapa final. Durante esta etapa ocurren reacciones complejas de ciclación, deshidratación, reorganización y condensación que originan dos diferentes compuestos finales: las melanoidinas y los compuestos avanzados de la reacción de Maillard.

Las melanoidinas son polímeros coloreados procedentes de reacciones de condensación de compuestos aminados de las etapas intermedias de la reacción de Maillard. Su estructura depende

tanto del tipo de alimento como de las condiciones a las que se llevó la reacción. Se pueden identificar ya que tienen rasgos distintivos en la región visible del espectro y poseen una menor solubilidad que los productos de la reacción de Maillard de un principio.

En cuanto a los compuestos avanzados de la reacción de Maillard (o “in vivo” AGEs) se originan debido a la oxidación o fragmentación de los azúcares, o sus uniones con proteínas. Estas están catalizadas por especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxinitrilos.

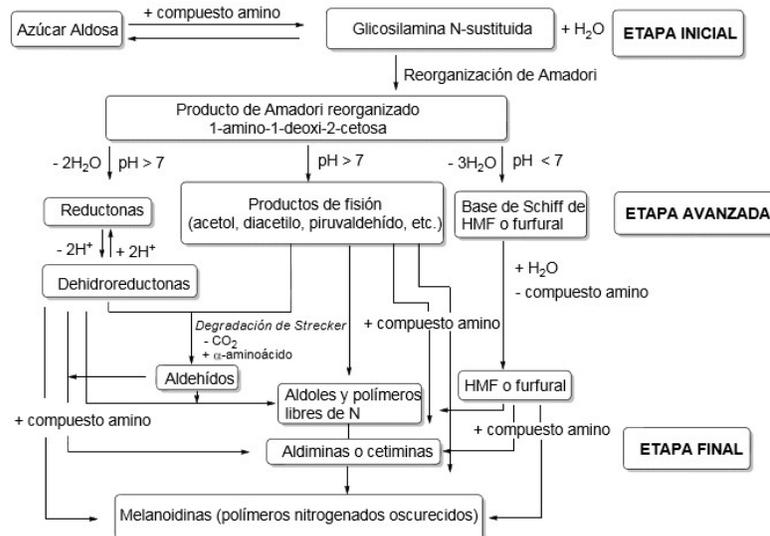


Figura 1 Esquema de la reacción de Maillard⁵.

Como se ha mencionado, las variables que modifican la reacción de Maillard son los sustratos, el pH, la actividad de agua, la temperatura y la presencia de metales⁴.

▪ Sustratos.

La reacción que se lleva a cabo entre el azúcar reductor (o el lípido oxidado) y el grupo amino libre del aminoácido, péptido o proteína es una reacción isomolecular; sin embargo, la pérdida del azúcar reductor es mayor al del grupo amino ya que al mismo tiempo se lleva a cabo la reacción química de caramelización*; por lo tanto, la intensidad de la reacción química dependerá de la naturaleza del azúcar reductor.

Las cetosas favorecen los productos de Heyns mientras que las aldosas los productos de Amadori. La reactividad es mayor con los carbohidratos de menor peso molecular que los de mayor peso molecular debido al impedimento estérico, en el caso de los isómeros, su configuración química es lo que lo determina.

El grado de pardeamiento de los azúcares ocurre de manera creciente de la siguiente forma:

- Pentosas ribosa>xilosa>arabinosa.
- Hexosas galactosa>manosa>glucosa>fructosa.
- Disacáridos maltosa=lactosa.

Además de depender de la naturaleza y reactividad de los azúcares, las proteínas son parte fundamental ya que todas pueden reaccionar con ellos a excepción de las proteínas no solubles como la queratina. La susceptibilidad es mayor para los α -aminoácidos terminales y para los que tienen un segundo grupo amino libre en comparación con los α -aminoácidos que están junto al grupo carbonilo en el enlace peptídico.

La intensidad de oscurecimiento será dependiente de la cantidad de lisina en los alimentos proteicos, esto por el grupo ϵ -amino. Algunos ejemplos de aminoácidos según su grado de oscurecimiento son lisina y glicina (alto), valina y fenilalanina (medio), arginina y cisteína (bajo).

*La reacción de caramelización ocurre cuando los azúcares se llevan a calentamiento por encima de su punto de fusión, sin necesidad de la presencia de oxígeno ni grupos amino, a actividades de agua bajas y pH ácidos o básicos. Como primer paso los monosacáridos se convierten en enoles y posteriormente se degradan las pentosas y las hexosas en 2-furaldehído y 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), respectivamente.

- pH.

La reacción de Maillard se ve condicionado por el pH inicial de los reactantes, así como la capacidad tampón del sistema. En el caso de un pH ácido, la velocidad y el desarrollo de la reacción es mínima, mientras que en un pH básico la velocidad y la aparición del color aumenta teniendo como máximo 10. Conforme avanza la reacción el pH tiende a disminuir debido a la formación de ácidos grasos de cadena corta y por falta de aminoácidos básicos.

Además, la reactividad del grupo amino aumenta cuando el aminoácido está en forma aniónica, por ejemplo, a pH 3 el ácido aspártico (aminoácido ácido) y a pH 10 la lisina (aminoácido básico) se alcanza su forma aniónica.

- Actividad de agua.

En el alimento, aumenta la velocidad de reacción cuando el contenido de humedad del sistema es de entre 3 y 7, a partir de 8 esta velocidad disminuye por la dilución del soluto en la fase acuosa. A un bajo contenido de agua la difusión de las especies químicas entre sí se detiene, mientras que a un alto contenido de agua es más fácil esa difusión y con eso el oscurecimiento. En el caso de que no hubiera o fuera muy poca la cantidad de agua, aun así podría continuar la reacción a partir del agua que sale de las deshidrataciones. Por otra parte, también el estado fisicoquímico en sistemas de alimentos es un factor que interviene en la reacción, dependiendo de que el sistema sea cristalino o amorfo, así como el porcentaje de grasa.

- Temperatura.

La reacción de Maillard tiene la capacidad de suceder tanto a temperatura ambiente como a altas temperaturas, llevándose un mejor desarrollo en la última mencionada. La temperatura a la que se lleva la reacción va asociada con el tiempo, por lo que una forma de predecir el oscurecimiento es la carga de calor, es decir la cantidad de calorías aplicadas al producto: tiempo calentamiento (minutos) x temperatura (°C)

Por las fuertes energías de activación de ciertas reacciones de oscurecimiento no se deben utilizar temperaturas tan altas y al almacenar se debe encontrar una temperatura media para evitar que continúe la reacción.

- Presencia de metales.

Los cationes metálicos logran mejorar la formación de compuestos dicarbonílicos o complejos por medio de reacciones de oxidación y por tanto acelerar el oscurecimiento, por ejemplo, las sales de cobre y hierro. El manganeso en cambio, la inhibe.

La reacción de Maillard en los últimos años ha recibido interés dentro de la investigación por la atención que tanto la industria alimentaria como el consumidor han puesto en cómo la dieta influye en la salud buscando un alimento procesado saludable, pero con las características sensoriales originales⁵.

5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF)

Procesar los alimentos nos permite tener la disponibilidad de ellos durante todo el año a diferencia de los alimentos frescos, además, en la mayoría de ellos se puede obtener un mayor valor nutricional al poder digerir y absorber los nutrientes, alargar su vida útil, mejorar sus propiedades organolépticas y garantizar su seguridad⁶. Entre el 80-90% de los alimentos que consume la población a nivel global son alimentos procesados⁵.

Uno de los procesos más utilizados es el tratamiento térmico, el cual, no solo se lleva a cabo industrialmente, sino que también en los hogares al asar, freír, hervir, hornear; por lo que es fácil que se produzcan otros compuestos como el HMF. El hidroximetilfurfural sirve como indicador para la calidad en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos reflejando un exceso de calentamiento o almacenamiento⁷.

El 5-hidroximetil-2-furfuraldehído es un aldehído furánico formado como intermediario en la reacción de Maillard, la cual procede como reacción de oscurecimiento no enzimático en presencia de

azúcares reductores y aminoácidos². También conocido como hidroximetilfurfural, 5-(hidroximetil)-furfural o simplemente HMF. Se ha encontrado en diferentes concentraciones en alimentos como la miel (10,4-58,8 mg/kg), jugos de frutas (2,0-22,0 mg/kg), galletas (0,5-74,5 mg/kg), café instantáneo (400-4100 mg/kg), fruta desecada (25-2900 mg/kg), pan blanco (3,4-68,8 mg/kg), pan tostado (11,8-87,7 mg/kg), entre muchos más⁵.

Su forma condensada es C₆H₆O₃ y su molécula se define por un anillo furánico con grupos funcionales de un aldehído y un alcohol, es muy soluble en agua y se caracteriza por su color amarillento caramelo. Tiene una masa molar de 126.11 g/mol, densidad 1.29 g/cm³, punto de fusión 30-34 °C y de ebullición 291 °C⁸. El hidroximetilfurfural tiene dos mecanismos de formación, uno por reacción de Maillard (a) y otro por caramelización (b) como se observa en la Figura 2⁵:

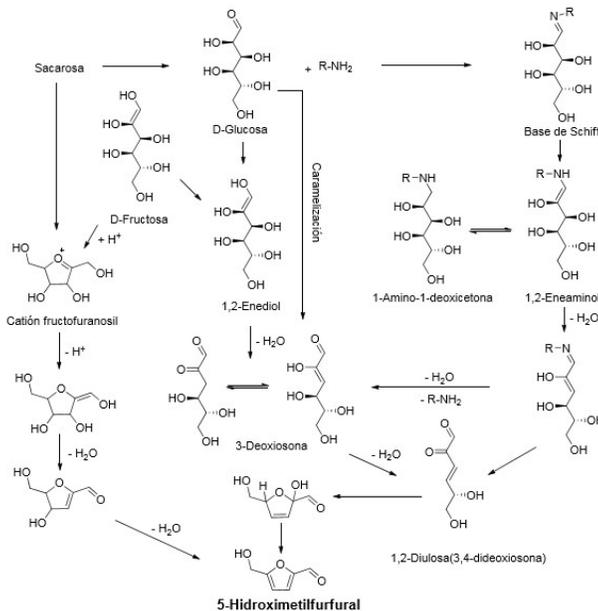


Figura 2 Mecanismos de formación del HMF⁵.

a) A pH neutro o ligeramente ácido el producto de Amadori produce el 1,2 eneaminoal, este pierde un grupo hidroxilo en el carbono 3, ocurre una desaminación en el carbono 1 y se hidrata formando como intermedio la 3-deoxiosona. La 3-deoxiosona se cicla y forma una hemiacetal que se hidrata formando el HMF. A esto se le conoce como enolización 1,2. El producto de Amadori es capaz de generar 10 veces más HMF que el azúcar y el aminoácido involucrado.

b) En comparación con el proceso anterior, este requiere una mayor energía de activación y temperaturas más altas, sin embargo, ocurre de manera similar por medio de reacciones de deshidratación y ciclación para llegar al HMF, se forma igualmente el intermediario 3-desoxiosona. * Cuando la humedad es baja, también se ha propuesto otro mecanismo en el que se degrada la sacarosa en fructosa formándose a partir de esto el catión reactivo fructofuranosil que produce directamente HMF.

Se reporta que el HMF es metabolizado por el ser humano eliminándolo por orina y heces, pero su absorción se ha relacionado con el contenido de fibra en la dieta. No se sabe con certeza que exista una relación directa en el consumo de HMF y sus efectos nocivos a la salud, aunque existen organismos que sugieren que el consumo de HMF tiene efectos de toxicidad y potencial carcinógeno; sin embargo, hay reportes que indican que tiene potencial antioxidante, anti-mutágeno, antibiótico y antialérgico. En el año 2005, la European Food Safety Authority (EFSA) estimó que la ingesta máxima diaria de HMF que no causa ningún daño es de 1.6 mg/kg peso corporal en humanos, el cual es superior al valor calculado sobre estudios toxicológicos para los animales (0.58 mg/kg al día)⁵.

Edulcorantes

Un edulcorante es aquella sustancia química o incluso natural que es capaz de sustituir el sabor dulce de un alimento.

Últimamente se consumen alimentos e incluso bebidas con altos contenidos de azúcar, lo que ha llevado a la población en general a padecer diferentes enfermedades y sobrepeso, pero existe una nueva tendencia en los alimentos de sustituir el azúcar por edulcorantes ya que se sabe que existen edulcorantes de tipo no calórico que ayudan a controlar su ingesta.

Sustituir azúcar por edulcorantes suele ser una de las principales recomendaciones médicas para perder peso o tratar la diabetes por sus diferentes beneficios a la salud⁹.

El azúcar en la sangre es una de las principales fuentes de energía de nuestro organismo por lo que debe estar presente en nuestra dieta; sin embargo, sabemos que cuando este se somete a temperaturas elevadas es transformado en su mayor parte a HMF.

La fructosa (o también conocida como levulosa) es un componente de la sacarosa y se encuentra de manera natural en las frutas y en la miel, aportando 4 kilocalorías por gramo. Es una hexosa con 6 átomos de carbono y con la misma fórmula que la glucosa, pero con diferente estructura ($C_6H_{12}O_6$), es soluble en agua y capaz de retener la humedad⁸. Actualmente los alimentos procesados lo suelen llevar como endulzante¹⁰.

De igual forma, la glucosa es encontrada en las frutas y en la miel y es una fuente importante de energía para el cerebro y ayuda al buen funcionamiento de las células¹⁰.

La glucosa es un carbohidrato y es el más simple en el metabolismo del ser humano, es una combinación de 6 moléculas de agua y 6 moléculas de dióxido de carbono. Está clasificada como un aldehído y es una hexosa, es decir, en su estructura contiene 6 átomos de carbono y puede encontrarse de forma lineal o de forma ciclada. Es también soluble en agua y es comúnmente utilizada en la industria de los alimentos¹¹.

Desde hace siglos la estevia ha sido utilizado por diferentes tribus y pueblos indígenas en América, por su sabor dulce y medicinal.

Actualmente la estevia es uno de los edulcorantes más comerciales y de fácil acceso, este suele ser 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa y proviene de origen natural obtenido de las hojas de la planta de estevia siendo un polvo blanco y fino. Su dulzor se debe principalmente a los glucósidos de esteviol, los cuales son los principales componentes naturales activos junto con los rebaudiosidos A, B, C, D, E y F; dulcósido A, y esteviolbósido¹².

La estevia es un edulcorante no calórico, no se absorbe en el organismo y es utilizada por las enteras bacterias. El sabor dulce de la estevia se debe principalmente a los glicósidos. Los glicósidos son moléculas compuestas por un glúcido que generalmente es un monosacárido y un compuesto no glucídico¹³.

La European Food Safety Authority reporta una nula toxicidad con una ingesta diaria de 4 mg/kg peso corporal¹⁴.

El manitol es un edulcorante obtenido por hidrogenación de la manosa que se utiliza ampliamente en la industria alimenticia y farmacéutica gracias a sus propiedades funcionales, aunque este tiene un poder edulcorante menor que la sacarosa tiene menos calorías. Pertenece al grupo de edulcorantes denominados polioles. Es un isómero del sorbitol y se comercializa típicamente en presentaciones granulares y en polvo¹⁵.

Autoridades que regulan la industria de los alimentos a nivel global como lo es el Codex Alimentarius, aseguran la inocuidad de dichos edulcorantes¹⁶.

Métodos analíticos

La voltamperometría cíclica es usada como un método cualitativo en el estudio de una especie desconocida con la finalidad de conocer al mismo. Esta consiste en aplicar al electrodo indicador una señal de excitación, es decir, un potencial. Al realizar un estudio se lleva a cabo un barrido de potencial desde un valor (E) inicial, hasta un valor que se denomina potencial de cambio de inversión (E_i) en el que la dirección de barrido se invierte. El margen de potenciales elegido es aquel en el que tenga lugar la oxidación o la reducción del analito¹⁷.

Presenta gran utilidad para caracterizar un compuesto, siendo una técnica rápida que determina potenciales redox, la estabilidad de los estados de oxidación, las reacciones químicas involucradas

y su velocidad, además de que no es aplicada rutinariamente¹⁸. A pesar de que pocos son los estudios que se han realizado para determinar HMF por esta técnica estos han estudiado su comportamiento con éxito, logrando establecer parámetros de calidad confiables, tal es el caso de Da Silva (2013).

La técnica HPLC es una técnica para el aislamiento y purificación de productos en la industria química y farmacéutica principalmente.

El hecho de que el HMF sea un producto colorido permite percibir la existencia de grupos cromóforos y sistemas de enlaces pi conjugados que están presentes en el compuesto y nos da la posibilidad de hacer uso de la técnica ultravioleta visible para determinar la banda de absorbancia y así poder hacer la comparación con el valor ya reportado en la literatura de 283 nm²⁰.

Se han realizado pruebas cuantitativas por HPLC-DAD con diferentes edulcorantes tales como la sacarosa, estevia y sucralosa, en los cuales se realizaba la prueba en galletas modelo. En esos estudios se ha encontrado una alteración en la cantidad de HMF que se sintetiza a partir del uso de estos edulcorantes; se encontró que la estevia fue el que tuvo menor producción de HMF obteniendo valores promedio de $6,49 \pm 0,5$ mg/kg²¹.

La técnica de espectrofotometría de absorción infrarroja es utilizada para ver el HMF de manera cualitativa. El IR es un tipo de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda específica para la identificación de compuestos. Para el HMF, ya están reportadas las señales que se deberían obtener y estudios han reportado solo engrosamiento de estas debido a otros productos que lo acompañan generados en la reacción de deshidratación²⁰.

PARTE EXPERIMENTAL

Producción de HMF

En vasos de precipitado se colocaron individualmente las siguientes cantidades:

Muestra 1: 3 g fructosa.

Muestra 2: 3 g glucosa.

Muestra 3: 3 g manitol.

Muestra 4: 3 g estevia.

Además del edulcorante, se agregaron 1.6 gramos de L-Lisina (considerando que cada pastilla triturada del aminoácido contenía 500 mg de L-Lisina en 0.8 g).

Cada muestra se hizo por duplicado cambiando solo el medio, uno en pH= 4 y otro en pH=10. Para lograr este medio se realizaron soluciones amortiguadoras con HCl e NaOH y se agregaron a la muestra hasta tener un volumen total de 40 mL. Posteriormente se agitó para disolver los sólidos.

Se escogieron esos pH ya que la reacción de Maillard se reporta ocurrir a la máxima velocidad de reacción en un pH máximo de 10, mientras que el HMF se produce desde un pH ligeramente ácido (sin especificar un valor) hasta un pH neutro.

El proceso de calentamiento se llevó a cabo en una mufla con la temperatura constante (sin necesidad de agitación) de 100 °C durante 40 minutos.

Además de las muestras, se prepararon en dos vasos de precipitado las matrices utilizadas, colocando en uno 1.6 g de L-Lisina y medio ácido pH=4, en otro colocando 1.6 g de L-Lisina y medio básico pH=10. Ambos, se sometieron a calentamiento a la misma temperatura y tiempo que las muestras.

Caracterización de HMF por voltamperometría cíclica

Se realizó el método de Da Silva (2013) con algunas modificaciones. Utilizamos el potencióstato Biologic modelo VSP-300 y una celda electroquímica compuesta por tres electrodos:

- Electrodo de referencia: Ag/AgCl (KCl sat.).
- Electrodo auxiliar: hilo de platino.
- Electrodo de trabajo: carbono vítreo (diámetro 3 mm, área 0.07 cm² aproximadamente).

Las condiciones para el comportamiento electroquímico del HMF se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1 Condiciones establecidas para análisis de HMF por voltamperometría cíclica.

Electrólito soporte	Velocidad de barrido (v)	Potenciales de reducción y oxidación
Solución saturada de KCl	20 mV/s	E ₁ = -1.5 V E ₂ = 0.5 V

Previo a realizar cualquier medición se limpiaron todos los electrodos. El electrodo de carbono vítreo se lijó y el de Ag/AgCl se llenó con solución saturada de KCl.

Los electrodos de hilo de platino y de Ag/AgCl se colocaron en un vaso de precipitado con agua destilada (sin sumergirlos por completo) y se sonicaron por 1 minuto y 5 minutos, respectivamente. Esto se realizó cada vez que había un cambio de muestra preparada con diferente edulcorante.

Antes de cada medición se burbujeó saturando la celda electroquímica con gas nitrógeno durante 6 minutos, lo que proporcionó una atmósfera inerte (libre de oxígeno) durante las mediciones.

Se agregó muestra (ya sometida a calentamiento) a la celda electroquímica y solución saturada de KCl hasta cubrir los electrodos, para así conectar los electrodos y realizar el análisis.

Se llevó a cabo el análisis también de las matrices utilizadas para eliminar interferencias.

Caracterización de HMF por HPLC-DAD

Se realizó la metodología de Castilla, Allcca, León & Yupanqui (2017) con algunas modificaciones para el análisis.

Las muestras (ya sometidas a calentamiento) se analizaron en el orden fructosa, glucosa, manitol y estevia con las condiciones cromatográficas establecidas en la Tabla 2.

Tabla 2 Condiciones establecidas para análisis de HMF por HPLC.

Fase móvil	Flujo de fase móvil	Volumen de inyección	Columna	Detector de arreglo de diodos
Ácido acético 0.0125 N con H ₂ O acidulada 95% y acetonitrilo 5%	1 mL/min	20 µL	C18, 5 µm, 4.6 x 150 mm	λ= 284 nm

Antes del análisis, se tomaron 1.5 mL de cada muestra (ya sometida a calentamiento) y se colocaron en viales separados para centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se filtró con un filtro de nylon utilizando una jeringa, depositándose la muestra filtrada dentro de un vial de 1.5 mL para su posterior análisis en el instrumento.

Se llevó a cabo el análisis también de las matrices utilizadas para eliminar interferencias.

Caracterización de HMF por FT-IR

El análisis cualitativo se llevó a cabo basándonos en la metodología de Capitillo & China (2017) en un espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer.

Previo al análisis se limpió con alcohol el área de la platina y se dejó secar. Como la muestra era líquida, se tomó una pequeña cantidad de cada muestra (ya sometidas a calentamiento) colocándola sobre la platina con la ayuda de una dona para evitar derrames.

Se utilizó la región comprendida entre 4000 a 650 cm⁻¹, realizando el análisis tanto de las matrices como de las muestras.

Al obtener el espectro infrarrojo se analizó la presencia de los diferentes grupos funcionales característicos del compuesto y se comparó con los ya reportados en literatura.

RESULTADOS

Previo al análisis de cada muestra se obtuvieron los blancos de cada medio en cada técnica analítica (Figura 3).

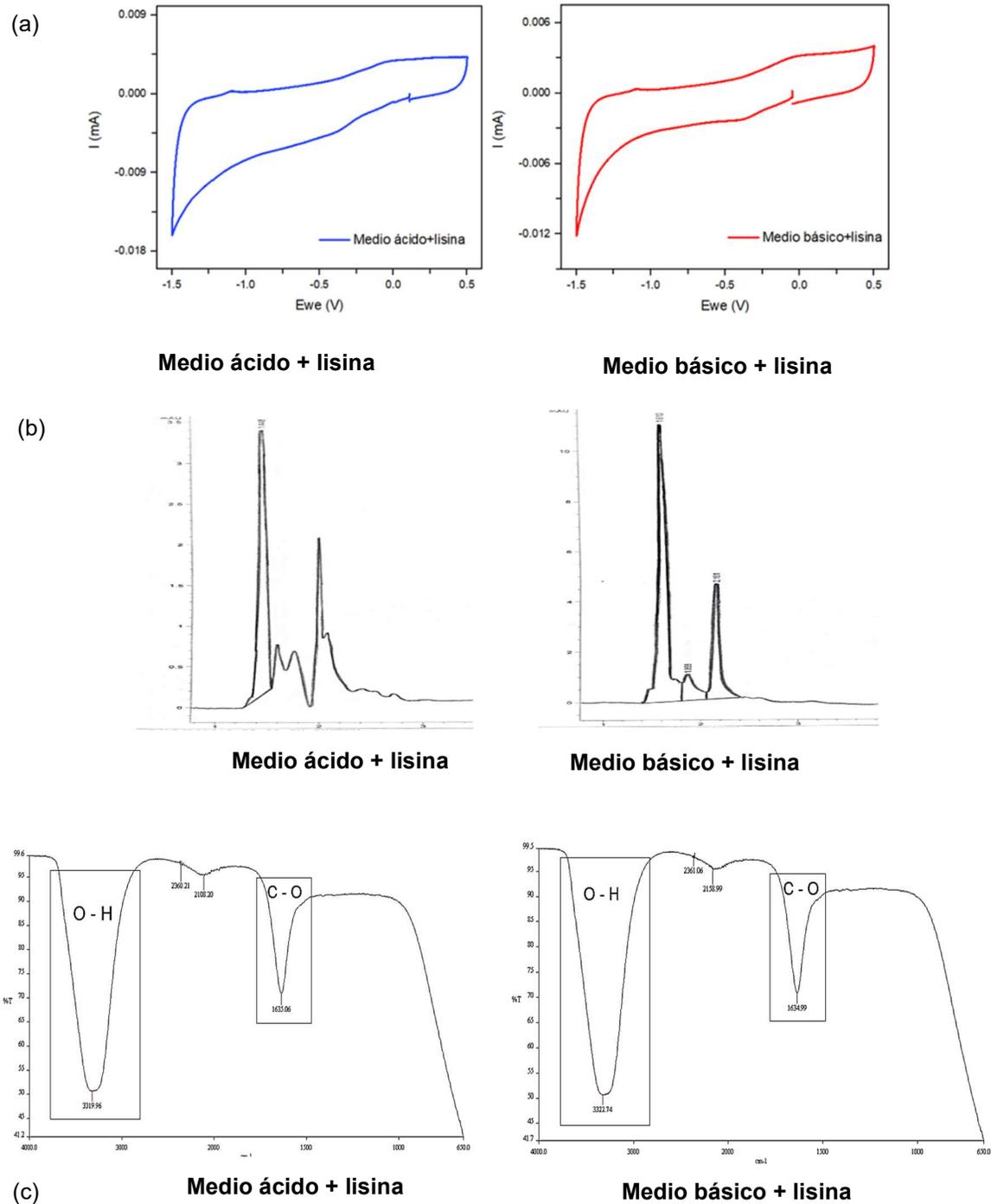


Figura 3 Matrices utilizadas; (a) voltamperogramas cíclicos, (b) cromatogramas, (c) espectros de infrarrojo.

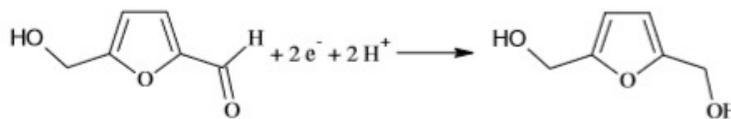


Figura 4 Reacción de reducción de 5-hidroximetil-2-furfuraldehído a 2,5-di-hidroximetil-furfuraldehído¹⁹.

A partir de los voltamperogramas cíclicos, logramos observar la reducción de 5-hidroximetil-2-furfuraldehído a 2,5-di-hidroximetil-furfuraldehído con un pico anódico de potencial aproximado de -1.25 V (basándonos en la fructosa) en las muestras, y además observamos que la reacción es irreversible, pues no hay un pico catódico de oxidación que lo demuestre (Figura 4).

Por HPLC, gracias al detector de arreglo de diodos (DAD) logramos identificar el pico similar al HMF en la longitud de onda de máxima absorción de 284 nm, verificando a través de la comparación de los cromatogramas de los blancos con cada muestra y valores de tiempo de retención del compuesto reportados con las mismas condiciones y tipo de columna. El tiempo de retención observado (basándonos en la fructosa) es de aproximadamente 2.9 min (Figura 5).

En varias muestras no hubo una separación completa del pico. Los picos más pronunciados que se pueden observar en los primeros minutos suponemos que corresponden a la pastilla utilizada para la L-Lisina u otros compuestos que se pudieron haber formado.

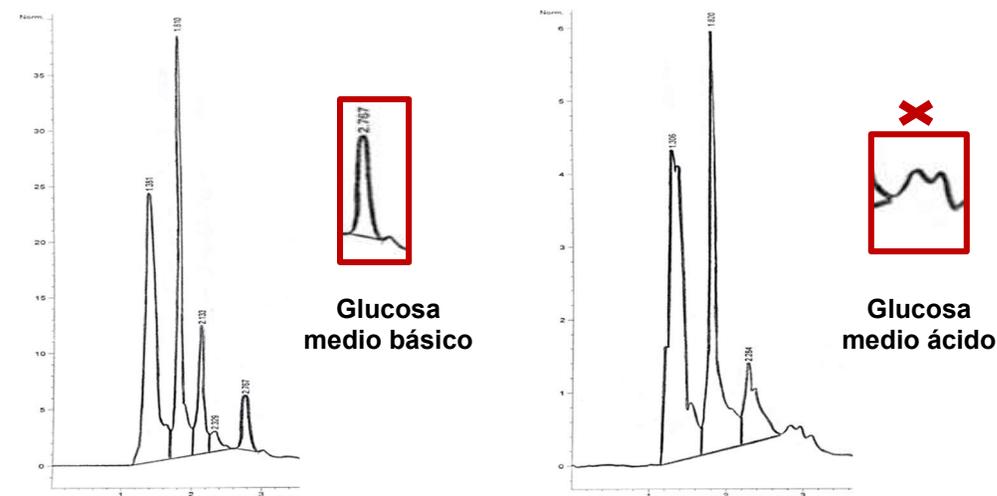


Figura 5 Cromatogramas de glucosa en ambos medios después de calentamiento.

Los espectros de infrarrojo nos permitieron identificar las bandas características de nuestra molécula resaltando las uniones C=C, O-H, C=O (Tabla 3).

Al comparar los espectros de los blancos y los de las muestras también podíamos notar un aumento en la intensidad de la banda, como es el caso de la banda aproximada a 3300 la cual representa el estiramiento del grupo O-H, lo que nos permite estar más seguros de la presencia de nuestra molécula buscada (Figura 6). En este tipo de análisis al no ser una sustancia pura, podemos identificar impurezas e incluso interferencias de lo que se encontraba en el medio, por lo que no es tan exacto y además no podemos asegurar por completo que se trate de nuestra molécula.

Tabla 3 Características de las bandas encontradas en los espectros.

Asignación	Señal (cm ⁻¹)	Descripción
O-H	Alrededor de 3300	Banda de estiramiento
-C=C	1520 - 1427	Bandas de estiramiento del anillo furano
>C=O	1680 - 1572	Banda fuerte de estiramiento del >C=O
-C=O	1740 - 1620	Banda de estiramiento del -C=O

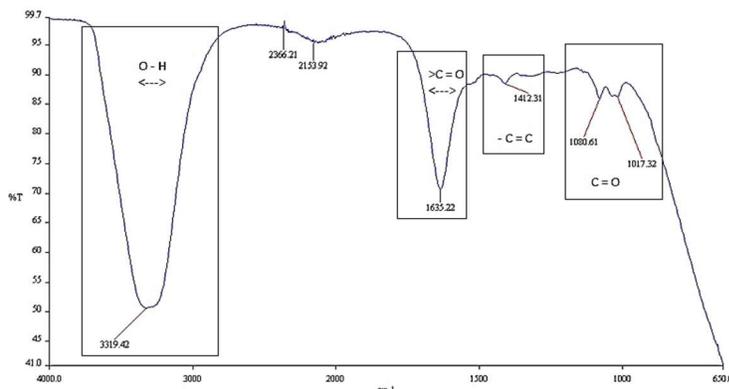


Figura 6 Espectro de infrarrojo de manitol en medio básico después de calentamiento.

En todas las técnicas se utilizó como referencia los resultados obtenidos a partir de la fructosa ya que, de acuerdo con la literatura y otros reportes, la fructosa al ser un monosacárido, hexosa y cetosa se asegura la formación de HMF (Figura 7). Además, deducimos que hubo mayor formación de HMF por la fructosa ya que ocurrió tanto la reacción de Maillard como la de caramelización, esta última debido a que el punto de ebullición de la fructosa es 103°C y al no lograr que sea tan constante la temperatura de la mufla hay una gran probabilidad que haya sido mayor a 100°C.

Se esperaba una mayor presencia de HMF a partir de la glucosa pues se establece que las hexosas y aldosas tienen mayor reactividad en la reacción de Maillard. Relacionamos la poca presencia de HMF en medio básico con la isomería de posición de la glucosa con la fructosa, ya que pudo ocurrir una tautomería ceto-enol al contar con la presencia de una base (Figura 8). Desconocemos la razón de la nula presencia de este azúcar en medio ácido (Figura 5).

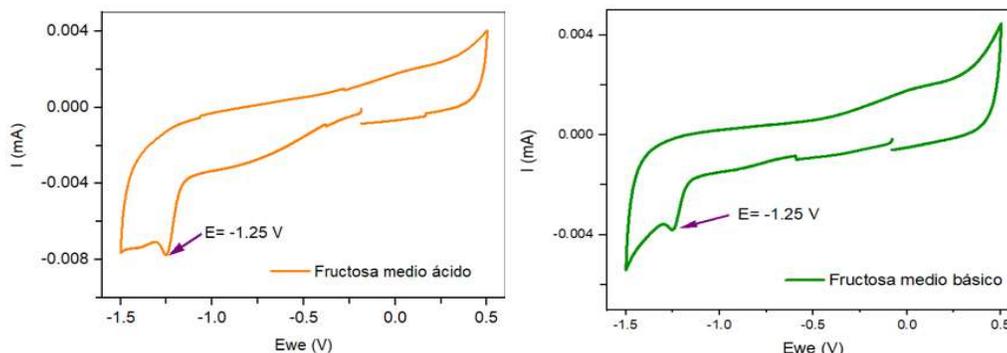


Figura 7 Comparación de voltamperogramas cíclicos de fructosa en ambos medios después de calentamiento.

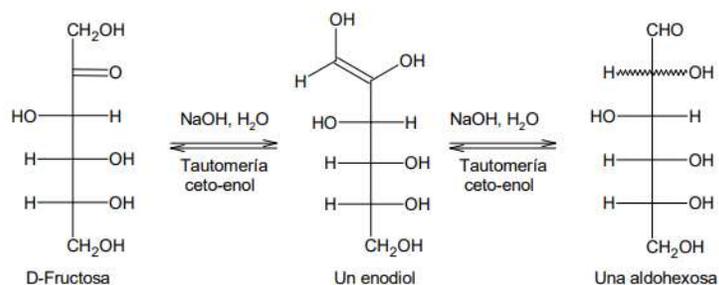


Figura 8 Equilibrio tautomérico ceto-enol catalizado por una base ²².

En el caso del manitol que produjo HMF tanto en medio ácido como en básico, sugerimos que la reacción de reducción de manosa a manitol por hidrogenación catalítica es reversible, llegando hasta fructosa a través de un enediol hasta fructosa por equilibrio de isomerización (Figura 9).

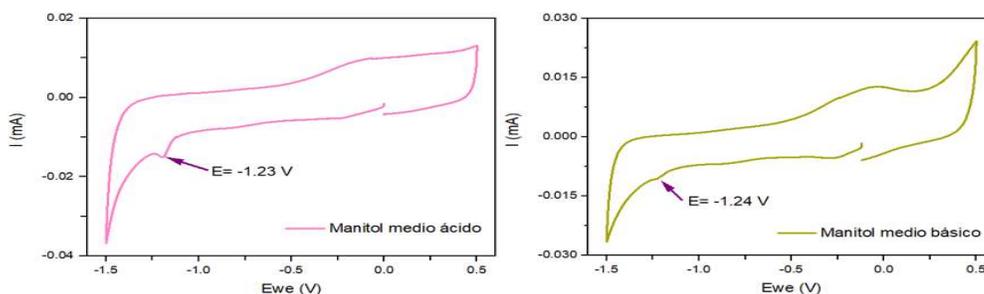


Figura 9 Comparación de voltamperogramas cíclicos de manitol en ambos medios después de calentamiento.

Para la estevia, relacionamos la presencia de HMF en medio ácido por los glucósidos de esteviol que pudieran estar presentes y lleven a cabo la reacción de Maillard. Se conoce que en las hojas desecadas de la estevia silvestre tiene proporciones de esteviósido (9.7%), rebaudiósido A (3.8%), rebaudiósido C (0.6%) y dulcósido A (0.3%)¹². No encontramos una razón válida para fundamentar la ausencia de HMF a partir de estevia en medio básico (Figura 10).

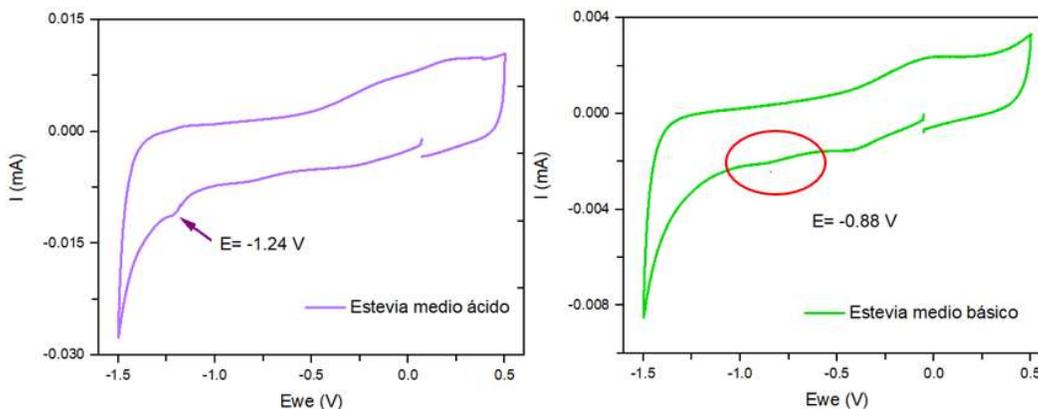


Figura 10 Comparación de voltamperogramas cíclicos de estevia en ambos medios después de calentamiento.

CONCLUSIONES

Se realizó la caracterización del 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF) por las tres diferentes técnicas analíticas descritas anteriormente, teniendo mayor sensibilidad en la caracterización por medio de voltamperometría cíclica, teniendo de igual manera concordancia en cuanto a los resultados obtenidos en cuanto a ausencia y/o presencia del HMF.

Se rechaza la hipótesis principalmente planteada, debido a que se encontró que en la fructosa en medio ácido fue la que mayor cantidad de HMF en proporción contenía, según los análisis realizados. En cuanto a los resultados obtenidos, sugerimos que el orden en el que los edulcorantes formaron más cantidad de HMF seguido de la fructosa, fue manitol > glucosa > estevia.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. A. J. S. Van Boekel, "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction", *Biotechnology Advances*, Vol. 24, 2, 2006, pp. 230–233.
2. E. Teixidó, O. Núñez, F. J. Santos, M. T. Galceran, "5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography", *Food Chemistry*, Vol. 126, 4, 2011, pp. 1902–1908.
3. H. Go., "La reacción de Maillard. Oscurecimiento no enzimático". México: Facultad de química UNAM. 2007. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/07LareacciondeMaillard_20547.pdf
4. S. Pastoriza. "Efecto de la ingesta de los compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre el metabolismo gastrointestinal". Universidad de Granada, España. 2013. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=59243>
5. L. Gema. "Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos". Universidad Complutense de Madrid, Madrid. 2013. <https://eprints.ucm.es/22281/1/T34594.pdf>
6. M. Van Boekel, V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, G. Eisenbrand, "A review on the beneficial aspects of food processing", *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 2010, 1215-1247.
7. M. Rada-Mendoza, A. Olano, & M. Villamiel, "Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods", *Food Chemistry*, 79, 2002, 513-516.
8. A. Pajares. "Estudio técnico-económico para la producción del 2,5 dimetilfurano como alternativa de biocombustible o aditivo". Universidad Nacional de Ingeniería de Lima, Perú. 2013. http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1540/1/pajares_ra.pdf
9. Rodero AB, Rodero LDS, Azoubel R. "Toxicity of Sucralose in Humans: A Review", *Int J Morphol.*, 27, 1, 2009, 239-44.
10. Alimentos Argentinos. "Edulcorantes". Argentina: Secretaría de Agroindustria. 2014. Recuperado de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_24_Edulcorantes.pdf
11. M. Olmo. "Glucosa". HyperPhysics Química. 2004. Recuperado de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Organic/sugar.html>
12. A. Cruz. "Bioquímica, farmacología y toxicología de *Stevia rebaudiana Bertonii*". Universidad Complutense de Madrid, Madrid. 2015.
13. V. Loria. "La stevia y su papel en la salud". Truvia. 2011. Recuperado de <http://biostevera.com/wp-content/uploads/2014/11/07-La-stevia-y-su-papel-en-la-salud-Informe-cient%C3%ADfico-por-Truv%C3%ADa.pdf>
14. European Food Safety Authority, "Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive", *EFSA Journal*, 8, 4, 2010, 1537.
15. K. Tandel, "Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits", *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2, 4, 2011, 236.
16. SS. Schiffman, M.B. Abou-Donia, "Sucralose revisited: Rebuttal of two papers about Splenda safety", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 63, 3, 2012, 505-508.

17. L. Hernández, & C. González. “*Voltamperometria. Introducción al análisis instrumental*”. 2012. Recuperado de <http://electroanalisis.blogspot.com/2012/03/introduccion-al-analisis-instrumental.html?m=1>
18. I González. “*Medidor de voltametría cíclica para dispositivos de transmitancia controlable*”. Universidad Carlos III de Madrid, Madrid. 2010. <https://core.ac.uk/download/pdf/30043615.pdf>
19. J. Da Silva. “*Detecção eletroquímica de furfural e hidroximetilfurfural em bagaço da cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência*”. Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2013. <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97825/000721744.pdf;jsessionid=FC83A7135DAACE74A23C7E646A427F65?sequence=1>
20. D. Capitillo, & C. China. “*Obtención de 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de fructosa utilizando una resina sulfonada*”, Rev. LatinAm. Metal. Mat., S7, 2017, 29-33.
21. N. Castilla, E. Allcca, N. León, & G. Yupanqui, “*Uso de edulcorantes comerciales como una alternativa a la reducción de 5-Hidroximetil-2- Furfural (HMF) en galletas modelo*”, Rev. Soc. Quím. Perú, 83, 2, 2017, ISSN 1810-634X.
22. J. Sandoval. “*Carbohidratos*”. México: Facultad de química UNAM. 2012. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/carbohidratos_14_22_1589.pdf

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIHEMOLÍTICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *CYMBOPOGON CITRATUS* SOBRE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.

Carlos Santiago Hernandez Iglesias¹, Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis², Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez¹, Raymundo Alejandro Pérez Hernández¹ y David Gilberto Garcia Hernandez¹

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas¹. Facultad de Odontología².

RESUMEN

Para la obtención del extracto de *Cymbopogon citratus* el material vegetal fue adquirido de manera comercial en las tiendas naturistas Pacalli, para la obtención del extracto se utilizó maceración dejando reposar un periodo de catorce días, finalizado este tiempo se eliminó la mayor cantidad del solvente por medio de la evaporación a presión reducida utilizando el rotavapor, una vez obtenido, se dejó reposar durante 48 h en un horno de secado para la eliminación de residuos del solvente, una vez finalizado el tiempo se prosiguió a obtener el porcentaje de rendimiento del extracto y posteriormente con la siguiente metodología para los ensayos: hemólisis sobre eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O Rh⁺, una vez determinada su actividad hemolítica se pasó para las pruebas microbiológicas que consistieron en la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria y actividad bactericida/bacteriostática sobre bacterias de importancia clínica, tales como: *Staphylococcus aureus* BAA-44, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 700611, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* Fármaco resistente, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, se observó que el extracto presentó una actividad bactericida frente a los microorganismos Gram negativos pero demostrando resistencia al extracto a menor concentración apreciándose de mejor manera con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y diferencia de las Gram positivas presentó una actividad bacteriostática, apreciándose de mejor manera en la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos durante siglos se han enfrentado con compuestos diversos, de los que hoy derivamos nuestros actuales antibióticos, y por consecuencia pueden actualmente tener resistencia de entrada.¹⁸ Hoy la gran mayoría de los procesos infecciosos se resuelven con tratamiento, pero es cada vez más frecuente encontrar en nuestra práctica y en los reportes científicos ejemplos de una amplia resistencia a los antibióticos.⁷

Por ello se buscó un plan de acción contra el crecimiento de la resistencia, la OMS esboza las actividades a diferentes niveles, que incluyen: generar y compartir información epidemiológica; aplicación de medidas de prevención de infecciones; Optimizar el uso de antibióticos a través del desarrollo de políticas nacionales y globales sobre el consumo y producción de antibióticos; restricciones sobre el consumo de antibióticos como promotores del crecimiento en ganado, y un uso razonado para el consumo humano. Además de estímulos para el estudio y desarrollo en el área.¹⁹

Por ello la búsqueda de metabolitos secundarios producidos por las plantas, como *Cymbopogon citratus* contra diversas enfermedades, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de diversos organismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo.

En este sentido, la búsqueda de compuestos activos comenzó a dar un giro importante, teniendo como objetivo utilizar estos compuestos con actividad biológica contra hongos, virus o cepas bacterianas, y en los últimos años aquellas que son resistentes a antibióticos. Por lo tanto, la estrategia de búsqueda de metabolitos novedosos se cambió lentamente en muchos laboratorios.²⁰

TEORIA

- 1.-Se pesaron 100 gr de las hojas secas de *Cymbopogon citratus*
- 2.-Se prosiguió en depositar los 100 gr en un matraz de un litro, se depositaron 500 mL de metanol absoluto.

- 3.-Se dejó reposar 2 semanas en metanol (se agitó una vez al día durante 10 minutos)
- 4.-El extracto líquido obtenido se filtró en un embudo de filtración rápida.
- 5.-El filtrado se llevó a sequedad en un equipo rotavapor a 40°C al vacío.
- 6.-El extracto se colocó en un frasco contenedor previamente tarado y se llevó a una estufa de secado a 40°C por 2 días.

Activación de las cepas.

Se utilizó el medio de cultivo líquido Müller-Hinton, con un pH de 7.2 +/-0.4 utilizando tubos de ensaye de 13 x 100 a los cuales se les agregó 3 mL del medio, se esterilizó y posteriormente se tomaron una asada del cultivo primario y se inoculó e incubó de 18 a 24 horas a 37°C (Barry and Fay. 1973).

Cultivo bacteriano.

Se utilizó el medio de cultivo agar Müller-Hinton se esterilizó y se vertió en cajas de Petri estériles, y se dejó por 24 horas para la prueba de esterilidad.

Las bacterias anaerobias se trabajaron en campana de anaerobiosis al 5% de CO₂ e incubadas a 35°C por 24 h a 5% de CO₂

Pruebas microbiológicas.

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en microplaca de 96 pozos, se colocaron 200 µl del tratamiento en el primer pocillo para realizar diluciones en los siguientes 6 pocillos los cuales se mezclaron con el medio de cultivo, posteriormente se inoculó el microorganismo de prueba, se dejó incubar a 37 °C/24 h y posteriormente se determinó por turbidez o por cambio de color en el medio la actividad microbiológica comparándola con el control de crecimiento.

Como prueba confirmatoria para la detección de posibles propiedades bactericidas, se tomó muestra del primer pocillo donde se observó turbidez (como punto de comparación) y también de donde no se observó turbidez se sembró por superficie en caja de Petri con agar nutritivo, 20 µl del contenido del pozo, dejando incubar por 24 horas a 37 °C; para posteriormente realizar la lectura.

Los microorganismos anaerobios (*Streptococcus mutans* ATCC 700611) se trabajó en una cámara de anaerobiosis e incubadas a 35°C por 24 h a 5% de CO₂

Pruebas Hemolíticas

Se obtuvo muestra de sangre según la NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012

Aislamiento y preparación de la sangre

Se requirió de sangre humana de grupo O+, se centrifugó 2.5 mL de sangre a 3000 rpm x por 15 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante de la superficie con cuidado y el precipitado se lavó 4 veces con Buffer de Fosfatos Salino isotónico, pH 7.4 (PBS).

Posteriormente los glóbulos rojos previamente obtenidos se aplicaron un tratamiento con el extracto metanólico de *C. citratus*.

PARTE EXPERIMENTAL

Tratamiento

Tomando 250 µL del paquete globular se suministraron en 6 tubos cónicos de 1.5 mL, de menor a mayor, concentración se suministraron de 975 hasta 997.5 µL de PBS, posteriormente se añadieron de mayor a menor 25 hasta 2.5 µL el extracto *C. citratus*.

	Extracto (μL)	PBS (μL)	P. G. (μL)
1	25	975	250
2	20	980	250
3	15	985	250
4	10	990	250
5	5	995	250
6	2.5	997.5	250

Tabla 8.- Concentraciones del Tratamiento

Una vez aplicado el tratamiento se incubó durante 30 min a 37 °C protegidos de la luz, para proseguir a centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, una vez pasado el tiempo de centrifugación se tomó 100 μL de cada tubo y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos, para determinar el porcentaje de hemólisis mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm.

Blanco:

Se tomaron 250 μL de PBS se suministraron en 6 tubos cónicos de 1.5 mL, de menor a mayor se suministró de 975 hasta 997.5 μL de PBS, se añadieron de mayor a menor 25 hasta 2.5 μL el extracto *C. citratus*.

	Extracto (μL)	PBS (μL)	PBS (μL)
1	25	975	250
2	20	980	250
3	15	985	250
4	10	990	250
5	5	995	250
6	2.5	997.5	250

Tabla 9.- Concentraciones del Blanco

Una vez aplicado el tratamiento se incubó durante 30 min a 37 °C protegidos de la luz, para proseguir a centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, una vez pasado el tiempo de centrifugación se tomaron 100 μL de cada tubo y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos, para determinar el porcentaje de hemólisis mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm.

Control positivo

Tomaron 250 μL de paquete globular y se suministraron en 6 tubos cónicos de 1.5 mL y se le suministró 1000 μL de agua destilada.

	A.D. (μL)	PBS (μL)
1	1000	250
2	1000	250
3	1000	250
4	1000	250
5	1000	250
6	1000	250

Tabla 10.- Concentraciones del Control positivo

Una vez aplicado el tratamiento se incubó durante 30 min a 37 °C protegidos de la luz, para proseguir a centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, una vez pasado el tiempo de centrifugación se tomó 100 µL de cada tubo y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos, para determinar el porcentaje de hemólisis mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm.

Porcentaje de hemólisis del tratamiento con el extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* sobre bacterias de importancia clínica.

Concentración (ppm)	Porcentaje de hemólisis (%)
1000	47.76
800	20.86
600	12.5
400	4.18
200	3.23
100	2.25

Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* sobre bacterias de importancia clínica.

Bacterias	CMI (ppm)
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA-44	125 ppm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	125 ppm
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700611	125 ppm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	250 ppm
<i>Escherichia coli</i> Fármaco Resistente	125 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	125 ppm
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 15308	125 ppm

Actividad bactericida/bacteriostático del extracto metanólico de *Cymbopogon citratus* sobre bacterias de importancia clínica.

Bacterias	Bactericida/bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA-44	Bacteriostático
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Bacteriostático
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700611	Bacteriostático
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bactericida
<i>Escherichia coli</i> Fármaco resistente	Bactericida
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Bactericida
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 15308	Bactericida

DISCUSIÓN

Durante las pruebas hemolíticas se obtuvieron resultados favorecedores para el uso del extracto metanólico de *Cymbopogon Citratus* ya que a una concentración menor de 600 ppm el extracto presentó un porcentaje de hemólisis que no supera más del 13% esto se puede comparar con las múltiples pruebas de toxicidad donde los estudios toxicológicos del extracto etanólico *C. citratus* utilizaron dos concentraciones, al 30 y 80 % con un contenido de sólidos totales equivalentes

a 0.57 y 4 % respectivamente, un contenido alcohólico de 23.5 y 70.4 %, en la cual la concentración al 80% mostró una alta toxicidad mientras que al 30% presenta un índice bajo de toxicidad ya que no se registraron muertes de roedores en ninguna dosis,^{6, 16} a pesar de las pocas diferencias entre los solventes, el metanol es más dañino para la salud humano que el etanol, debido a que el metanol es absorbido y rápidamente distribuido en el organismo, generando una acidosis sistémica la cual puede llegar a causar ceguera y una severa intoxicación¹. Las diferentes polaridades de ambos solventes permiten obtener diferentes compuestos de interés han demostrado la superioridad del uso de solventes polares (etanol) sobre solventes no polares (n-hexano) en la extracción de sustancias antioxidantes, sin embargo, puede presentarse variación de resultados en función del antioxidante de referencia utilizado, así como de las condiciones y tiempos de reacción aplicados¹⁷. Una misma muestra analizada puede mostrar valores de capacidad antioxidante muy disímiles en función de la técnica utilizada dado que en cada caso se determinan propiedades o mecanismos antioxidantes diferentes del metabolito de interés.⁷ Cabe destacar que se ha encontrado que la hierba de limón tiene propiedades antioxidantes, antidepresivas, antisépticas, astringentes, bactericidas, y fungicidas, que son atribuidas a sus principales compuestos terpenos como citral (alrededor de 65-80%, citral es una mezcla de neral y geranial), limoneno, β -mirceno, citronelal y geraniol¹⁴. Por otro lado, la concentración necesaria para una actividad importante contra cepas de importancia clínica no supera la concentración 400 ppm (4% de hemólisis) esto a su vez se ve reflejado en la actividad que tuvo el extracto contra las bacterias Gram negativas y Gram positivas, observando una actividad importante e inhibiendo considerablemente el crecimiento de éstas, debido a que las propiedades antimicrobianas se le atribuyen tres compuestos específicos que son: el α -citral y el β -citral que individualmente actúan sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas y el mirceno que por sí solo no presenta actividad antibacteriana apreciable¹⁵. A su vez se menciona que *Cymbopogon citratus* es efectiva contra una amplia gama de bacterias patógenas, incluyendo aquellas que presentan mecanismos de adaptación.^{8, 10} Las bacterias Gram positivas presentaron una mayor resistencia contra el extracto, debido a la actividad bacteriostática que presento sobre estas, a pesar de esto, las bacterias *S. mutans* y *E. faecalis* se observó que su crecimiento se vio afectado aun en concentraciones menores a 125 ppm mientras que el crecimiento de *S. aureus* no se vio afectado en menores concentraciones, esta resistencia se le atribuye a que tiene la habilidad para formar agregados conocidos como biopelículas, lo cual le proporciona protección contra antibióticos, desinfectantes y las defensas naturales del hospedero¹⁹. Pero el daño sobre *S. aureus* se puede comparar con los resultados donde después de 24 h de exposición a 0.125 % del aceite de *C. citratus*, se observó que la integridad estructural de la biopelícula fue interrumpida, mientras que a 0.5 % el daño fue más evidente, y a 1 % se inhibió la formación de biopelícula por lo que la actividad del extracto de *Cymbopogon citratus* se puede considerar efectiva². Esto a diferencia de las bacterias Gram negativas, el extracto tuvo una actividad bactericida, pero se apreció que a menores concentraciones de 125 ppm el crecimiento de las bacterias no se vio afectado, esta sensibilidad puede ser atribuida a que las bacterias Gram positivas presentan en su estructura una membrana citoplasmática cubierta por la pared celular, mientras que las bacterias Gram negativas presentan además otra membrana lipídica externa que cubre toda la célula¹². Esta característica de doble membrana, es un factor importante en la resistencia de bacterias Gram negativas a la presencia de agentes antibacterianos. A su vez esto se ve reflejado en la cepa *P. aeruginosa* la cual mostro una mayor resistencia que las otras bacterias Gram negativas, que eran inhibidas a una concentración de 125 ppm mientras que *P. aeruginosa* fue a 250 ppm. *Pseudomonas aeruginosa* exhibe muchos mecanismos de resistencia, incluyendo enzimas que modifican a los antimicrobianos como β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos permitiendo su resistencia a múltiples antimicrobianos¹¹; *C. citratus*, su extracto mostró un efecto antibacteriano significativo en contra de las cepas *S. aureus*, *Sh. flexneri*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, y baja actividad frente a *P. aeruginosa*³. demostrando que puede utilizarse para tratamientos de afecciones intestinales como la salmonelosis y el cólera, este mecanismo es debido a la parte lipofílica de estos compuestos les permite interaccionar principalmente con la membrana lo que genera apertura de poros o canales, este daño provoca que el material de la célula sea liberado y la muerte de ésta^{5, 13}.

CONCLUSIÓN

Se obtuvo el extracto metanólico por el método de maceración, siendo efectivo para la gran mayoría de las cepas a una concentración de 125 ppm y sólo para *P. aeruginosa* a 250 ppm; Por otra parte la actividad hemolítica mayor fue de 13% a una concentración de 600 ppm lo que significa que no es hemolítica según la literatura revisada, además las múltiples propiedades de *C. citratus* y su eficacia contra bacterias de importancia clínica, apuntan que en combinación con un tratamiento de antibióticos podría potenciar en gran medida la respuesta contra las bacterias multifármacorresistentes y usarse como una respuesta alterna a los antimicrobianos que se conocen hoy en día.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Abramson A, Singh S. Treatment of alcohol intoxications: ethylene glycol, methanol and isopropanol. *Nephrology and Hypertension*. 2000; 9(6):695-701.
2. Adukwu, E. C., Allen, S. C. H. y Phillips, C. A. (2012). "The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 113(5): 1217-1227.
3. Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. (2001). Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 62 (2), 156 – 161.
4. Bachiega, T. F y J.M. Sforzi, *Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages*. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 909-913 (2011).
5. Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review." *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
6. De la Torres Mellis, R.A. y N. Capiro Trujillo. Estudio de la actividad tóxica y genotóxica de una decocción de la planta caña santa (*Cymbopogon citratus*). *Revista Biología*. III (2):11-13, 1989.
7. Fernández-Pachón, M. S., Villa ´ no, D., Troncoso, A. ´ M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad ´ antioxidante in vitro del vino y valoración de sus ´ efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 56, 110-122.
8. Hammer, K. A., Carson, C. y Riley, T. (1999). "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts." *Journal of applied microbiology* 86(6): 985-990.
9. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(11):996-1011.
10. Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47(5): 565-573.
11. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. Role of the MexEFOprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55 (12): 5676-84. doi: 10.1128/AAC.00101-11.
12. Poole, K. (2001). "Multidrug resistance in Gram-negative bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 4(5): 500-508.
13. Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). "Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials."
14. Schaneberg, B. T. y Khan, I. A. (2002). "Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemongrass by GC." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1345-1349.
15. Shah, G., R. Shri, V. Panchal, N. Sharma, B. Singh, and A.S. Mann. 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (*Lemon grass*). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2:3-8. doi:10.4103/2231-4040.79796.

16. Unsurungsie, M. Mutagenicity screening of popular THAI Species. Food cosmet. Toxicol 20:527-30,1982.
17. Vagi, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vasarhelyine Peredi, K., Balázs, A., Blázovics, A., & Simandi, B. (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 17-21.
18. Wellington EMH, Boxall AB, Cross P, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. Lancet Infect Dis. 2013;13(2):155-65.
19. WHO MS. Draft Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2014:1-20.
20. Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M. y Greenberg, E. P. (2004). "Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms." Journal of bacteriology 186(6): 1838-1850.
21. Yung P (1997) The microbial world: Foundation of the world. ASM News. 63: 417-421.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL ZNO-M ($M=$ CO, CU, FE Y MG) EN LA DEGRADACIÓN DEL COLORANTE NARANJA DE METILO

M.G. Ramírez-Quezada¹, I.L. Meza-Álvarez², J. Páramo-Vargas², J.O. Saucedo Lucero*¹

¹Centro de Investigación Aplicada a Tecnologías Competitivas (CIATEC A.C.), ²Universidad Tecnológica de León (UTL).

magperamirezquezada@gmail.com; jsaucedoiatec.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron los materiales modificados de ZnO-M ($M=$ Co, Cu, Fe y Mg) en la fotodegradación de un contaminante orgánico modelo (naranja de metilo). Los materiales fueron sintetizados por el método sol-gel; añadiendo en 1% en peso los iones metálicos. Posteriormente, fueron caracterizados mediante las técnicas de difracción de rayos X, espectroscopia de reflectancia difusa UV-Vis y punto de carga cero. La actividad fotocatalítica de los materiales se evaluó en la reacción de fotodegradación de naranja de metilo bajo irradiación ultravioleta (254 nm) en condiciones ambientales de presión y temperatura.

Se observó que la incorporación de los iones metálicos ocasionó un cambio en el tamaño de los cristales, que oscilaron entre los 22 y 37 nm, por otro lado, la energía de borde de los materiales no mostró un cambio significativo, con valores entre 3.10 y 3.22 eV, lo que sugiere que no hubo cambios en las propiedades electrónicas, pero si modificaciones estructurales significativas como en la orientación y crecimiento de la celda unitaria a causa de la interacción con el metal añadido.

El material que presentó un mayor porcentaje de remoción fue el ZnO con un 99% seguido del Mg-ZnO con un 98%, Cu-ZnO - 97%, Fe-ZnO - 87% y Co-ZnO - 77%, sin embargo, el cálculo de la constante de velocidad determinó que el ZnO-Mg lleva a cabo la reacción de forma más rápida con un valor de $K= 0.0941 \text{ min}^{-1}$, seguido del ZnO con $K= 0.0776 \text{ min}^{-1}$, demostrando una mejora cinética con la adición del magnesio.

INTRODUCCIÓN

Los avances de la industria química sin duda alguna han propiciado una mejor calidad de vida de la población en general, gracias a la creación e incorporación de nuevos agentes químicos sintéticos con múltiples beneficios en productos fármacos, de cuidado personal, de limpieza, mejora de procesos industriales, agrícolas, entre otros, sin embargo las descargas no controladas de estos compuestos químicos han provocado la dispersión en el medio de una gran diversidad de compuestos sintéticos, cuyas consecuencias dañinas hacia el hombre y los ecosistemas ya se han estudiado pero muchos otros aún se desconocen (Manahan, 2007).

Una de las mayores preocupaciones medioambientales es la seguridad del agua y la presencia potencial de nuevos compuestos químicos, su gran importancia se deben a sus particulares propiedades fisicoquímicas, las cuales favorecen el desarrollo de un gran número y variedad de procesos químicos y biológicos en la naturaleza, procesos que se han visto afectados por la incorporación antropogénica de una gran diversidad de contaminantes refractarios (Manahan, 2007). Es por ello por lo que en la actualidad la contaminación de los sistemas acuáticos es un problema universal, como consecuencia del vertimiento de aguas residuales sin tratamiento o pretratamiento, siendo los compuestos sintéticos como los colorantes uno de los mayores retos debido a su carácter tóxico y persistencia en el sistema. Los colorantes tipo azo son compuestos químicos que se caracterizan por la presencia de uno o más grupos $N=N$ en su estructura, lo que les provee de alta estabilidad química y los vuelve recalcitrantes a los procesos de degradación química y microbiana. Debido a su carácter tóxico y difícil degradación están ligados a una serie de efectos nocivos para la salud humana y los ecosistemas, afectando el sistema inmunológico y respiratorio, además de ocasionar desórdenes de índole sexual, mal funcionamiento del sistema endócrino y ser potencialmente carcinogénicos. Por otro lado, también se ha demostrado que son causantes de alteraciones en fauna silvestre, tendiendo como consecuencia en las especies discapacidad reproductiva, deformaciones fisiológicas, deficiencias en la producción hormonal, además de provocar eutrofización en el sistema, entre otros efectos (Herrmann, 1999).

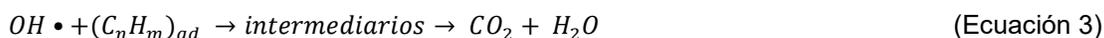
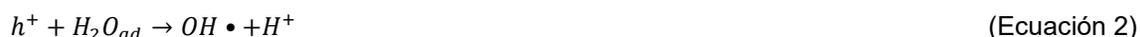
Es por ello por lo que se han propuesto diversos procesos de oxidación avanzada (POA) para la mineralización de una gran variedad de contaminantes orgánicos. Estos procesos involucran el uso de agentes químicos altamente oxidantes (O_3 , H_2O_2 , reactivo Fenton, entre otros) con el fin de mineralizar contaminantes orgánicos e inorgánicos de una manera más efectiva y conseguir altas eficiencias. Dentro de estos procesos, la fotocatalisis heterogénea sobresale de los distintos POAs debido a que presenta diversas ventajas como el no requerir la adición de agentes químicos externos, ya que este proceso se caracteriza por generar radicales libres *in-situ* sobre la superficie de un catalizador (óxidos metálicos) mediante la incidencia de luz UV o visible.

En este sentido, el diseño y mejora de catalizadores tiene como objetivo principal aumentar la eficiencia del proceso para lograr la mineralización del contaminante, así como optimizar el intercambio de electrones en la superficie. Para ello se requiere mejorar las propiedades tanto físicas como electrónicas de los fotocatalizadores creando materiales híbridos con la adición de pequeñas cantidades de otros materiales. El presente trabajo se centra en estudiar el efecto de la adición de iones metálicos de cobre, cobalto, hierro y magnesio en la estructura del semiconductor ZnO , evaluando el material en la aplicación de una reacción de fotodegradación del colorante naranja de metilo bajo condiciones ambientales de presión y temperatura.

TEORÍA

Fotocatálisis heterogénea

La fotocatalisis heterogénea es un proceso de oxidación avanzada (POA) capaz de trabajar bajo condiciones normales de presión y temperatura. En este proceso se emplea la incidencia directa de luz en el sistema funcionando como energía impulsora para la activación de un catalizador en estado sólido (comúnmente óxidos metálicos; MO), este material es capaz de capturar fotones con energía igual o mayor a su energía de banda (*band gap*), generando portadores de carga negativo y positivo, denominados pares “electrón-hueco” (e^{*-} , h^+ ; Ecuación 1), los cuales al contacto con moléculas de agua son responsables de la producción de radicales $OH\cdot$ (Ecuación 2), agente altamente oxidante (potencial de oxidación 2.8 eV). Es por ello por lo que se dan lugar a reacciones redox en la superficie del semiconductor que llevan a la oxidación total o parcial de los contaminantes (hasta productos inocuos como CO_2 y H_2O) (Ecuación 3).



Para una adecuada aplicación de la fotocatalisis heterogénea en fase acuosa, existen varios parámetros que influyen de forma directa como son:

- pH: debe trabajarse a un pH donde el punto de carga cero del material utilizado beneficie el contacto con el tipo de contaminante en específico que se está trabajando.
- Influencia del oxígeno: el oxígeno es necesario para la mineralización completa del contaminante y no debe competir con las otras especies durante la adsorción sobre el catalizador. La concentración de oxígeno afecta directamente la velocidad de reacción, la cual aumenta con la presión parcial del oxígeno en el agua.
- Intensidad de la luz: la velocidad con la que se llevará a cabo la reacción es proporcional a la intensidad de la luz, esta es específica para cada proceso.
- Catalizador: el material utilizado debe tener las propiedades electrónicas adecuadas para el tipo de irradiación que se quiera utilizar en el proceso.

De acuerdo con este último punto, se han estudiado una amplia gama de materiales semiconductores, los de interés para el proceso de fotocatalisis son sólidos generalmente óxidos metálicos donde los átomos constituyen una red cristalina tridimensional infinita. El espectro de energía de los electrones en un cristal ideal consiste en grupos de estados de energía llenos (llamados también bandas de valencia (B.V.)) y estados de energía vacíos (bandas de conducción (B.C.)). Entre estas bandas de energía existe una zona en la que no es posible que permanezca un

electrón por falta de estados de energía, a esta zona es la denominada “*band gap*”, banda prohibida o ancho de banda óptico. Del valor de este ancho de banda óptico dependen las características electrónicas del material, si es mayor a 4 eV es denominado dieléctrico y si es cercana o igual a cero se le denomina metal, en cualquier otra circunstancia se denomina semiconductor (J. Rodríguez et al., 2005).

Entre los materiales semiconductores más utilizados en la fotodegradación catalítica se encuentran algunos óxidos metálicos, sin embargo, los de mayor potencial en condiciones de incidencia de radiación UV, se encuentran el TiO₂ y ZnO. No obstante, sus valores característicos de energía de borde ($E_g > 3.2$ eV) limitan su fotoactividad bajo la incidencia directa de luz solar; lo que sería deseable dado que la fracción UV del espectro solar es ~5%. Otro factor limitante es la rápida recombinación de los pares electrón-hueco fotogenerados, dando pie a la inhibición o baja eficiencia en la producción de radicales hidroxilos, superóxidos y peróxidos.

El ZnO es un semiconductor del tipo *n* debido a que su densidad de cargas son mayoritariamente electrones, por otra parte, los semiconductores cuyos portadores de carga son mayoritariamente huecos, son llamados del tipo *p*. Tiene una energía de banda (*band gap*) de ~ 3.2 eV, siendo el segundo material más comúnmente utilizado para la degradación fotocatalítica de contaminantes orgánicos, después del TiO₂.

Actualmente existe una gran diversidad de estudios en el campo de la fotocatalisis que posicionan al ZnO como un material con una gran eficiencia en la degradación de una diversidad de contaminantes. Algunas de las ventajas que presenta el ZnO sobre el TiO₂ es que además de poseer similares propiedades ópticas y electrónicas, presenta características antibacteriales y no toxicidad al ambiente, al igual que una menor fotocorrosión, ya que el TiO₂ no es resistente a la fotocorrosión anódica y comienza a liberar oxígeno, por otro lado, el ZnO en medio básico se mantiene estable. También se ha observado que en algunos casos absorbe energía en un intervalo más amplio del espectro electromagnético dando lugar a una activación catalítica más eficiente (Theerthagiri et al., 2018).

En la actualidad se estudia la mejora del proceso de fotocatalisis, diseñando materiales que sean capaces de activarse en el espectro de luz visible, buscando su aplicación de una forma más sencilla y económica, utilizando la incidencia directa de luz solar. Para ello una de las técnicas que más se ha utilizado es la síntesis de materiales híbridos, convirtiéndose en una de las alternativas más efectivas para mejorar la conductividad electrónica y ampliar el espectro de los semiconductores a través de la reducción de su *band gap*.

Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Ba-abbad et al., 2013, donde analizaron las propiedades ópticas del fotocatalizador ZnO modificado con Fe. Los materiales fueron sintetizados por el método sol-gel, incorporando distintas concentraciones del dopante (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0% en peso). Los materiales fueron evaluados mediante una reacción fotocatalítica para la degradación de 2-clorofenol, exponiendo la solución a irradiación solar entre las 11:00am y las 14:30pm durante aproximadamente 1 hora, tomando muestra cada 15 minutos. Los resultados reportaron que a medida que la concentración de Fe aumentó de 0,25% a 1% en peso, el tamaño del cristal y su *band gap* disminuyeron en comparación con el ZnO sin dopar. Sus resultados evidenciaron que aun los materiales con las concentraciones más pequeñas de hierro tuvieron cambios significativos estructurales, principalmente en el desplazamiento de su banda hacia valores de menor energía.

Por otro lado en el trabajo realizado por Jongnavakit et al., 2012, se fabricaron películas delgadas de ZnO añadiendo Cu, soportando sobre sustratos de vidrio mediante el método sol-gel. Sus resultados mostraron que el tamaño de la película disminuye conforme la concentración de Cu aumenta. En este trabajo la actividad fotocatalítica de las películas fue evaluada con la degradación del azul de metileno. La película que mostró una mayor actividad fotocatalítica fue la dopada con 0.5% moles de Cu. Como resultado de las mediciones del *band gap* de las películas, estas no registraron algún cambio en los valores, las concentraciones bajas y altas de dopaje mostraron los mismos valores de banda, por lo que la actividad fotocatalítica se le podría atribuir a otra característica del material que en el trabajo como tal no se discute, quizá a modificaciones estructurales como al tamaño del cristal o área superficial y por consiguiente la cantidad de sitios activos, o a las condiciones de reacción del medio como el pH de trabajo.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Materiales

Los reactivos precursores para la síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc puras y modificadas se enlistan a continuación:

1. Acetato de zinc dihidratado ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): J.T. Baker.
2. Acetato de magnesio tetrahidratado ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): J.T. Baker.
3. Cloruro cúprico dihidratado ($(\text{CuCl}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): MALLINCKRODT.
4. Cloruro de cobalto hexahidratado ($(\text{CoCl}_2) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): J.T. Baker.
5. Nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$): CTR.

Síntesis

La síntesis de los materiales se realizó por el método sol-gel reportado previamente por Ba-abbad, et al., 2013. Para ello, una solución de ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ 1 M) disuelto en etanol fue añadida por goteo a una solución de acetato de zinc ($\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$; 1M) previamente disuelto en etanol, manteniendo en agitación vigorosa y una temperatura de 65°C por 30 minutos.

El gel obtenido fue secado hasta quedar libre de solvente y posteriormente se calcinó a 450°C por 2 horas. Las soluciones acuosas de los óxidos metálicos fueron incorporadas a la mezcla de síntesis durante la etapa de formación del gel, procurando una carga nominal del 1% de los iones de Fe, Mg, Co y Cu.

Caracterización

La estructura cristalina de los materiales fue determinada por difracción de rayos X de polvos, en un *Bruker D8 Advance* con una fuente de irradiación CuK α . Por otro lado, el tamaño promedio de cristal fue calculado utilizando la ecuación de *Debye-Scherrer*.

Los valores de energía de borde (E_g) se calcularon mediante el método de *Tauc* a partir de los espectros de reflectancia difusa UV-Vis (200 – 1200 nm) modificados por la función de *Kubelka-Munk*.

La determinación del punto de carga cero (pH P.C.C) se llevó a cabo mediante titulación potenciométrica, en una tituladora automática *Ti-Touch 916 Metrohm* bajo atmósfera de nitrógeno y utilizando soluciones estandarizadas de ácido clorhídrico (0.1M) e hidróxido de sodio (0.1M) para el control de pH.

Evaluación de la actividad fotocatalítica

Las pruebas de fotodegradación catalítica se llevaron a cabo en un reactor por lotes de paredes concéntricas, geometría cilíndrica y fabricado de cuarzo. El reactor está equipado con un sistema de recirculación de agua para el control de la temperatura en la mezcla de reacción y una lámpara de irradiación de luz UV ($\lambda=254\text{nm}$ y $I=0.09\text{ mW/cm}^2$) ubicada en el centro del reactor (*Figura 1*).

La mezcla de reacción fue compuesta por 30 ppm de naranja de metilo ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$) en 250 mL de agua desionizada y 0.5 g de catalizador. Los experimentos se trabajaron con una solución de reacción a un pH equivalente al P.C.C. determinado para cada material, (ZnO-Fe: 8.8, ZnO-Mg: 11.1, ZnO-Co:8.9 y ZnO-Cu:8.6).

Previo a la evaluación catalítica, los materiales se mantuvieron en contacto con la solución de reacción durante una hora en oscuridad y agitación vigorosa, para determinar la capacidad de adsorción del material. Posterior a ello, se encendió la lámpara, estableciendo este momento como el inicio de la reacción ($t=0$).

Para cada reacción se recolectaron alícuotas de 0.3 mL cada 3 minutos. El avance de la reacción se determinó a partir de la variación en la concentración de naranja de metilo en la solución, determinada en espectrofotómetro UV-Vis *Genesys 30 Thermo Scientific* dando seguimiento a la banda ubicada en $\lambda=466\text{ nm}$. De igual forma se corrió una prueba sin catalizador para determinar la contribución de fotólisis en el sistema.



Figura 1. Reactor fotocatalítico para fase acuosa.

RESULTADOS

Caracterización de materiales:

Difracción de rayos X

Las señales de difracción mostraron que la fase predominante en todos los materiales corresponde a la de ZnO con una estructura cristalina hexagonal tipo wurtzita con direcciones preferenciales en los planos 100, **002**, 101, 102, 110, 103, 200, 112, 201, 004 y 202 (JCPDS 80-0075).

Los difractogramas de los materiales sugieren que la estructura ZnO-*M* formada posee relativamente alta cristalinidad (Figura 2), cabe señalar que no se resolvieron picos de difracción que pudiera relacionarse con la presencia de otra fase cristalina distinta o con la presencia de los iones metálicos añadidos. Esto último podría estar relacionado con una alta dispersión de especies de Co, Cu, Fe y Mg (cristalitos < 5nm; por debajo de la resolución del equipo) o por la baja concentración de iones (~ 1%). No se observaron corrimientos significativos en las bandas de difracción asociadas al ZnO-*M*, por lo que no se tiene evidencia suficiente para asegurar la sustitución intersticial de iones en la red cristalina del ZnO.

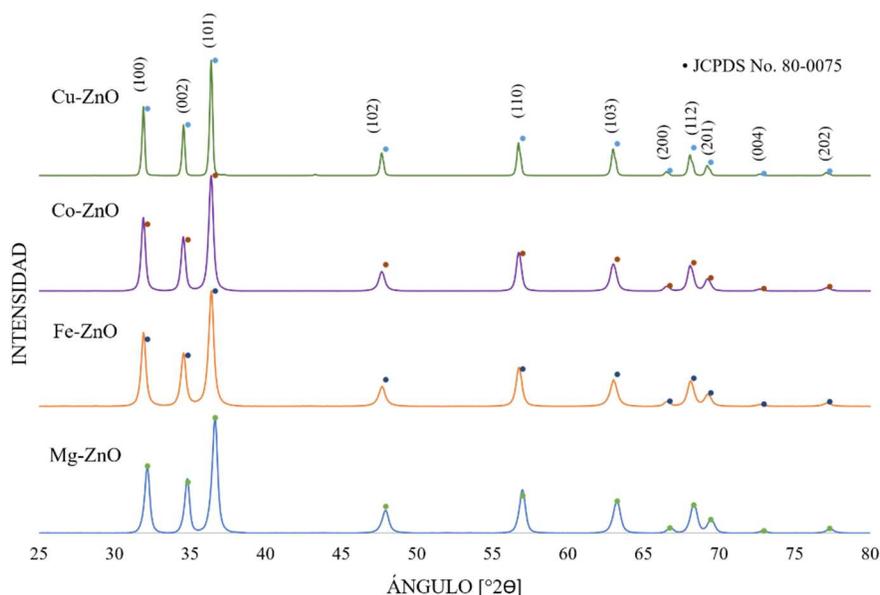


Figura 2. Difractogramas de las nanopartículas de ZnO=M; M=Mg, Fe, Co y Cu.

No obstante, la determinación del tamaño de cristalito (Tabla 1) por el método de *Scherrer* evidenció un efecto de la incorporación de los iones sobre el tamaño de las nanopartículas, ya que cada material mostró un tamaño distinto, esto podría estar relacionado con un cambio en la formación, acomodo, orientación y/o crecimiento de la celda unitaria a causa de la interacción con los metales añadidos, siendo los materiales ZnO puro y ZnO-Mg los que presentaron un menor tamaño promedio con 22 nm, cambio significativo respecto al material ZnO-Fe con 37 nm. En este sentido, se sugiere que el debido a que estos materiales presentaron un menor tamaño de cristal pudo estar relacionado con el hecho de que presentaron una mejor actividad catalítica que el resto de los materiales, mostrando una mayor estabilidad térmica y resistencia a la sinterización de las nanopartículas durante el proceso de calcinación.

Espectroscopia de reflectancia difusa UV-vis

Respecto a la energía de borde (E_g) de los materiales, estos no mostraron cambios significativos respecto al ZnO puro (Tabla 1), lo que sugiere que no hubo cambios o sustituciones intersticiales y con ello se descarta una posible modificación en las características electrónicas de los materiales. Sin embargo, se observó que el material ZnO puro presentó el menor valor de energía de borde ($E_g=3.10$ eV), aunque las variaciones en los valores fueron mínimas, fue posible verificar que el material ZnO presentó mejor actividad catalítica que el resto de los materiales, lo que sugiere que tal variación en E_g podría estar relacionada con un ligero aumento en capacidad de absorción de fotones del ZnO, a su vez, presentando mayor resistencia a la fotocorrosión y con ello el aumento el lapso de recombinación de los electrones entre la banda de valencia y la de conducción. Este comportamiento es comúnmente asociado con una disminución en el tamaño del cristalito.

Punto de carga cero

El punto de carga cero (P.C.C.) hace referencia al valor del pH en el que la carga neta (externa e interna) de las partículas es neutra. De forma particular, este parámetro se determinó con el objetivo de ajustar las condiciones de la reacción y facilitar el contacto del contaminante y la superficie fotoactiva. Para el caso particular del naranja de metilo, el cual posee un comportamiento de ácido débil, se ajustó el pH de la mezcla de reacción para favorecer la interacción electrostática entre el compuesto contaminante y la superficie del catalizador. Como se observa en la Tabla 1, los materiales tuvieron ligeros cambios en el valor de P.C.C., lo que pudiera atribuirse a modificaciones superficiales

por efecto de la incorporación de los iones metálicos de Cu, Co, Fe y Mg, siendo el ZnO-Mg el material que presentó un mayor cambio en el balance de cargas superficiales respecto al ZnO puro.

Tabla 1. Resultados de las técnicas de caracterización.

Material	Tamaño cristalito (nm)	Band Gap (eV)	P.C.C.
ZnO	22	3.10	9.1
ZnO-Cu	33	3.19	8.5
ZnO-Co	27	3.12	8.9
ZnO-Fe	37	3.14	8.8
ZnO-Mg	22	3.22	11.1

Evaluación de la actividad fotocatalítica

Con el fin de evaluar el rendimiento catalítico de los materiales en la degradación de compuestos orgánicos e identificar algún efecto en la modificación del material, se realizaron evaluaciones cinéticas en la reacción de fotodegradación del colorante naranja de metilo. La capacidad de adsorción de los catalizadores se determinó previamente, en condiciones de completa obscuridad, estableciendo que el proceso de adsorción alcanza equilibrio en un periodo de una hora.

Derivado de las evaluaciones realizadas con una mezcla de reacción al pH ajustado, se observó que el material que presentó un mayor porcentaje de remoción al final de la reacción fue el material ZnO con un 99% seguido del ZnO-Mg con un 98%, ZnO-Cu - 97%, ZnO-Fe - 87% y ZnO-Co - 77%.

Tal como se presenta en la Figura 3, al final de la reacción los materiales ZnO y ZnO-Mg consiguieron prácticamente el mismo porcentaje de degradación, sin embargo, el fenómeno que se observa es que durante el transcurso de la reacción el material ZnO-Mg degrada a una mayor velocidad cinética, esto es congruente con los valores de la constante de velocidad cinética calculados.

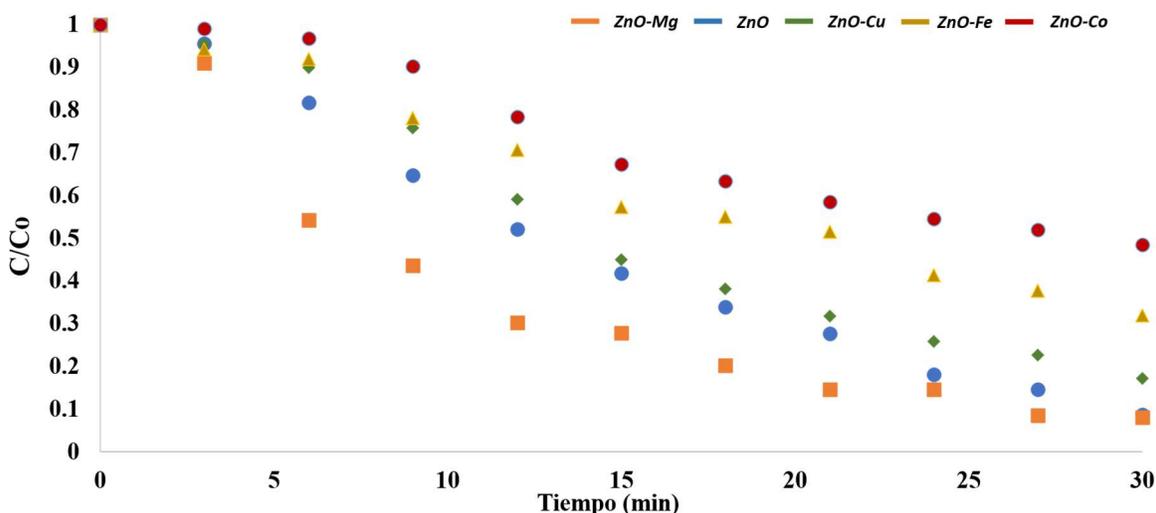


Figura 3. Concentraciones normalizadas vs tiempo de reacción de los materiales ZnO=M; M=Mg, Fe, Co y Cu.

Este comportamiento por parte de los materiales también es coherente con los resultados obtenidos en la caracterización de los materiales, ya que el ZnO fue el material que presentó un menor tamaño de cristal y un menor valor de energía de borde, además de que se trabajó a un pH básico, brindando mayor estabilidad al cristal de ZnO frente a la corrosión, por lo que se sugiere que la ligera disminución en el valor de pH pudo haber afectado la estabilidad del material y por ello presentaron mayor grado de fotocorrosión.

Por otro lado, el cálculo de la constante de velocidad de los materiales (*Tabla 2*) determinó que el material ZnO-Mg lleva a cabo la reacción de forma más rápida con un valor de $K_{app} = 0.0941 \text{ min}^{-1}$ seguido del ZnO con $K_{app} = 0.0776 \text{ min}^{-1}$, demostrando una mejora en la actividad catalítica con la adición del magnesio.

Catalizador	$K_{app} (\text{min}^{-1})$
ZnO	0.0776
ZnO-Mg	0.0941
ZnO-Cu	0.0697
ZnO-Fe	0.0406
ZnO-Co	0.0264
Fotólisis	0.0184

Tabla 2. Constantes cinéticas aparentes (k_{app}) de los materiales.



Figura 4. Mezcla de reacción. Izquierda: $t=0$; Derecha: $t=30 \text{ min}$ (~99% conversión, ZnO-Mg)

Por otro lado, se evidenció que el ajuste en el pH de la mezcla de reacción tuvo efecto sobre la actividad catalítica. En particular, para el caso del catalizador ZnO-Mg se logró un incremento significativo en el valor de punto de carga cero ($\text{pH} = \text{P.C.C.} \sim 11$; $k_{app} = 9.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) respecto a los valores del ZnO puro ($\text{pH} = \text{P.C.C.} \sim 9$; $k_{app} = 7.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

En este caso, se logró una conversión cercana al 98% en 30 minutos, apreciando la decoloración de la mezcla de reacción a simple vista (Figura 4). En este caso, el pH de la mezcla de reacción por encima del P.C.C. del material estaría favoreciendo el transporte del contaminante hacia la superficie activa, debido a que la superficie estaría incrementando el balance neto de cargas superficiales y a su vez, favoreciendo la atracción electrostática del contaminante hacia la superficie cargada debido a su naturaleza catiónica. En este caso, la incorporación del Mg estaría modificando las propiedades superficiales del ZnO, aportando alcalinidad a la superficie, y brindando una mayor estabilidad a la fotocorrosión por la alcalinidad del medio.

CONCLUSIONES

Se logró modificar el perfil cinético del material ZnO con la incorporación de los iones metálicos de Mg, Cu, Fe y Co durante la síntesis sol-gel, esto se evidenció al mostrar cambios significativos en el comportamiento de los materiales, obteniendo distintos porcentajes de degradación, así como en su constante de velocidad, siendo el material ZnO-Mg el que presentó mejores características catalíticas con una mayor degradación en un menor tiempo de reacción.

Por otro lado, aunque los difractogramas evidenciaron que no se resolvieron picos de difracción que pudiera relacionarse con la presencia de otra fase cristalina relacionada con los iones metálicos añadidos, si se evidenciaron cambios en los tamaños promedios de cristal, siendo los materiales ZnO puro y ZnO-Mg los que presentaron un menor tamaño promedio con 22 nm, esta podría ser una característica relacionada con el hecho de fueron los materiales con mejor rendimiento catalítico.

Por otro lado, el incremento en actividad también podría estar relacionado con la modificación del pH de reacción, esta modificación al P.C.C. específico para cada material brindaría una mayor dispersión de nanopartículas originada por la funcionalización de la superficie, que daría origen interacciones superficiales más favorables entre catalizador-contaminante. Además, el

comportamiento de los materiales reforzó la teoría de que el material ZnO se vuelve más estable en pH básico, ya que los materiales que obtuvieron una constante de velocidad y porcentaje de degradación mayor (ZnO y ZnO-Mg) mayor son los que se trabajaron a un pH mayor que el resto de los materiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ba-abbad, M. M., Amir, A., Kadhum, H., Bakar, A., Takriff, M. S., & Sopian, K. (2013). Journal of Industrial and Engineering Chemistry "Optimization of process parameters using D-optimal design for synthesis of ZnO nanoparticles via sol – gel technique", 19, 99–105.
2. Herrmann, J. (1999). "Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants", 53, 115–129.
3. J. Rodríguez, Roberto J. Candal, José Solís, Walter Estrada, M. A. B. (2005). El fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones. Solar Safe Water, 135–152.
4. Jongnavakit, P., Amornpitoksuk, P., Suwanboon, S., & Ndiege, N. (2012). Applied Surface Science Preparation and photocatalytic activity of Cu-doped ZnO thin films prepared by the sol – gel method, 258, 8192–8198.
5. Manahan, S. E. (2007). Introducción a la química ambiental (REVERTÉ ED). España.
6. Theerthagiri, J., Chandrasekaran, S., Salla, S., Elakkiya, V., Senthil, R. A., Nithyadharseni, P., Arasu, M. V. (2018). Recent developments of metal oxide based heterostructures for photocatalytic applications towards environmental remediation. Journal of Solid-State Chemistry, 267(August), 35–52.

ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UN PRODUCTO CAPILAR CON EXTRACTO DE *OPUNTIA FICUS*

Guadalupe López Olivares, José Armando Narváez Padilla, Ana Lilia Padilla Velasco, Lidia Meléndez Balbuena, Ismael Soto López

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
guadamax@yahoo.com.mx

RESUMEN

Opuntia ficus es una planta de cactus comestible que crece en las regiones áridas y semiáridas del mundo, también conocida como higuera de palo, chumbera, nopal o palera, tuna espinosa, cactus de misión o cactus ficus además de sus usos culinarios es rica en ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, fibras, aminoácidos y compuestos antioxidantes como fenoles, flavonoides, betaxantina y compuestos antioxidantes como fenoles, flavonoides, betaxantina y betacianina.

En el presente trabajo se presenta la elaboración de un producto de uso capilar con un aditivo natural obtenido a partir del nopal que es un producto de fácil adquisición en la ciudad de Puebla y que se cosecha en grandes cantidades en los alrededores dentro del Estado. El nopal tiene propiedades hidratantes y ayuda en las irritaciones de la piel, ayuda a la renovación celular y promueve el crecimiento del cabello, por lo anterior es un ingrediente ideal para un shampoo para cabello, además de la elaboración del producto es importante realizar pruebas físicas, químicas y de funcionalidad entre otras al shampoo con extracto de *opuntia ficus* para garantizar la calidad del producto terminado.

Se realizó la extracción 100 gramos de nopal con 500ml de agua destilada colocándolo en trozos a ebullición durante quince minutos, posteriormente se retiraron los sólidos del agua y se filtró con tamiz malla 200.

Para elaborar el shampoo se procedió a pesar el lauril éter sulfato de sodio en un recipiente y agregar la amida de coco y la cocamidopropilbetaina, mezclar procurando no hacer espuma, agregar la mitad del total de agua destilada y mezclar siempre procurando no hacer espuma, aparte disolver el metil parabeno en agua destilada y agregar a la mezcla, agregar el extracto de nopal y terminar de agregar el agua restante mezclar y finalmente agregar el cloruro de sodio mezclar.

Para el control de calidad se determinó el pH y se realizaron pruebas de irritabilidad dérmica de acuerdo a la normatividad mexicana vigente.

La prueba de irritabilidad dérmica se realizó con conejos de aproximadamente 1600 gramos cada uno, de sexo indistinto, fueron rasurados un día antes de aplicar la muestra, se aplicó la muestra simultáneamente en los costados del conejo en piel intacta y en piel erosionada, cubriendo ambos costados con gasa (parche semiocluido). La observación de la piel se realizó a las 24 y 72 horas posteriores a la aplicación de la muestra.

Se elaboraron dos formulaciones de shampoo para cabello que presentan buena apariencia, hacen buena cantidad de espuma y limpian adecuadamente.

De las pruebas de control de calidad el pH de ambos shampoos se encuentran entre 7 y 8 lo cual es adecuado para utilizarse en el producto y de las pruebas de irritabilidad dérmica realizadas en conejos el resultado fue ligeramente irritante, lo cual hace al producto apto para su uso.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la industrialización es importante tener un conocimiento cabal de la composición química de las diferentes partes de la planta. Este conocimiento es indispensable para tener éxito tanto en la elección de las tecnologías de procesamiento más adecuadas que se pueden aplicar como en las condiciones de aplicación de las mismas, a fin de obtener productos inocuos, nutritivos y de alta calidad. Por lo tanto, las partes de la planta cuyas características interesa conocer mejor por sus amplias posibilidades de utilizar son los frutos y los cladodios. Las flores se consideran también, al igual que los cladodios o nopalitos, una verdura y se pueden consumir como tales.

La evolución de la composición de algunos parámetros hasta la madurez (pH, sólidos solubles, fibra) deberá ser tenida en cuenta dependiendo del proceso a que se someterá la fruta o los cladodios y más directamente al producto a que se quiera destinar.

La mayoría de los otros aditivos de *champú* no son ingredientes verdaderamente activos, que se incluyen por razones de comercialización en lugar de rendimiento. Los *shampos* anticaspa han sido un área de crecimiento en los últimos años, con varios ingredientes activos que pueden dañar la piel o provocar problemas mayores a los que se quiere eliminar al utilizarlos. Actualmente tienen mayor auge los productos para aseo personal con ingredientes naturales, entre ellos los shampoos capilares.

La elaboración de un producto con ingredientes de extractos de naturales es un aporte tanto al bienestar de las personas por su uso en si higiene tanto como el bienestar ambiental ya que muchos componentes de los productos con aditivos químicos dañan el ambiente y el ecosistema al intoxicar a especies marinas por ejemplo.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó la extracción 100 gramos de nopal con 500ml de agua destilada colocándolo en trozos a ebullición durante quince minutos, posteriormente se retiraron los sólidos del agua y se filtró con tamiz malla 200.

Para elaborar el producto capilar se utilizaron los ingredientes que se muestran en la tabla número 1.

Ingrediente
Lauril éter sulfato de sodio
Amida de coco
Cocamidopropilbetaina
Metil parabeno
Extracto de nopal
Aroma
Cloruro de sodio
Agua destilada

Tabla número 1. Ingredientes de la formulación de shampoo.

El procedimiento que se siguió es el siguiente:

Pesar el lauril éter sulfato de sodio en un recipiente y agregar la amida de coco y la cocamidopropilbetaina, mezclar procurando no hacer espuma, agregar la mitad del total de agua destilada y mezclar siempre pscurando no hacer espuma, aparte disolver el metil parabeno en agua destilada y agregar a la mezcla, agregar el extracto de nopal y terminar de agregar el agua restante mezclar y finalmente agregar el cloruro de sodio mezclar. En la imagen 1 se muestran los ingredientes y el producto terminado.



Imagen 1. Ingredientes y producto terminado

Se elaboraron dos productos variando únicamente la cantidad del extracto disminuyendo la cantidad de agu destilada como se muestra en la tabla número 2.

Ingrediente	Cantidad Formulación 1	Cantidad Formulación 2
Lauril éter sulfato de sodio	25.0 %	25.0 %
Amida de coco	5.0 %	5.0 %
Cocamidopropilbetaina	5.0 %	5.0 %
Metil parabeno	1.0 %	1.0 %
Extracto de nopal	10.0 %	15.0 %
Aroma	1.0 %	1.0 %
Cloruro de sodio	3.0 %	3.0 %
Agua destilada	50.0 %	50.0 %

Tabla número 2. Ingredientes de las dos formulaciones de shampoo.

Para el control de calidad se determinó el pH y se realizaron pruebas de irritabilidad dérmica de acuerdo a la normatividad mexicana vigente.

La prueba de irritabilidad dérmica se realizó con conejos de aproximadamente 1600 gramos cada uno, de sexo indistinto, fueron rasurados un día antes de aplicar la muestra, se aplicó la muestra simultáneamente en los costados del conejo en piel intacta y en piel erosionada, cubriendo ambos costados con gasa (parche semiocluido). La observación de la piel se realizó a las 24 y 72 horas posteriores a la aplicación de la muestra.

RESULTADOS

Se elaboraron dos formulaciones de shampoo para cabello que presentan buena apariencia, hacen buena cantidad de espuma y limpian adecuadamente.

De las pruebas de control de calidad el pH de ambos shampoos se encuentran entre 7 y 8 lo cual es adecuado para utilizarse en el producto y de las pruebas de irritabilidad dérmica realizadas en conejos el resultado se muestra en la tabla 3, 4 y 5.

Reaccion cutanea eritema	Conejo 1				Conejo 2			
	24 horas		72 horas		24 horas		72 horas	
Condiciones del parche	D	I	D	I	D	I	D	I
Piel intacta	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel erosionada	0	1	0	0	1	1	0	0

Tabla 3. Resultado de irritabilidad dérmica en conejos

Reaccion cutanea eritema	Conejo 3				Conejo 4			
	24 horas		72 horas		24 horas		72 horas	
Condiciones del parche	D	I	D	I	D	I	D	I
Piel intacta	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel erosionada	1	1	0	0	0	1	0	0

Tabla 4. Resultado de irritabilidad dérmica en conejos

Grado de irritación:	0.500
Interpretación:	No irritante
Observación:	Probablemente inocuo en contacto con la piel.

Tabla 5. Interpretación de resultados de irritabilidad dérmica en conejos

CONCLUSIONES

El producto elaborado funciona adecuadamente además de ser ligeramente irritante, presentar buen aspecto, no requiere de aplicación de colorante y es estable a condiciones ambientales hasta por ocho meses presentando buena apariencia transcurrido ese tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmacopea de los estados unidos mexicanos sexta edición. MGA 0515 Irritabilidad en piel.
2. Villegas y de Gante M. 1997. Los Nopales (*Opuntia spp.*) recursos simbólicos tradicionales en México. pp 271-273.
3. Carmen Sánchez. 2007. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas de la FAO 162. pp 9

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE CASTELA TEXANA SOBRE BACTERIAS PRESENTES EN TRASTORNOS DE CARIES DENTAL Y GINGIVITIS

Yadira Quiñones Gutierrez, María Porfiria Barrón Gonzalez, Beatriz Licea Guajardo, Yareli Marlen Hinojosa Rincon

Universidad Autónoma de Nuevo León
yadiragtz70@hotmail.com

RESUMEN

La caries dental es uno de los trastornos más comunes, después del resfriado, suele aparecer en los niños y en los adultos jóvenes, pero puede afectar a cualquier persona y es la causa más importante de pérdida de los dientes en las personas más jóvenes. Mientras que la gingivitis se debe a los efectos a largo plazo de los depósitos de placa, un material adherente compuesto por bacterias, moco y residuos de alimentos que se desarrolla en las áreas expuestas al diente. Por otra parte, *Castela texana*, una planta endémica del noroeste de México, presenta múltiples compuestos químicos con actividad parasitocida, sin embargo, existen pocos estudios relativos del potencial inhibitorio sobre bacterias orales y al potencial tóxico. Es por tal motivo la importancia de determinar la actividad biológica *in vitro* de los extractos metanólicos de tallo, hoja y corteza de *Castela texana* sobre cepas relacionadas a la caries dental y gingivitis. En este trabajo se realizó la extracción metanólica del tallo, hoja y corteza, para la detección de metabolitos secundarios por medio de pruebas colorimétricas, posteriormente se evaluó la actividad biológica *in vitro* sobre dos cepas relacionadas a caries dental y gingivitis a concentraciones de 0,1 y 10 mg/mL por el método presuntivo de espectrofotometría a 635 nm y por el método de recuento bacteriano en placa (RBP). Las pruebas colorimétricas indican que el extracto metanólico de la hoja fue el único que presentó insaturaciones con la prueba de $KMnO_4$ y así para flavonoles con la prueba H_2SO_4 . El método turbidimétrico o presuntivo indica que a concentraciones de 10 mg/mL el extracto del tallo presentó la mayor actividad biológica, tanto para bacterias relacionadas a la caries dental y a gingivitis, mientras que en el recuento bacteriano en placa, los extractos a base de hoja presentaron mayor actividad biológica en el caso de bacterias relacionadas a la gingivitis a concentraciones de 1 mg/mL y para el caso de caries a concentraciones de 10 mg/mL. Los resultados obtenidos indican que el extracto metanólico de la hoja de *Castela texana* presenta actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de dos cepas relacionadas a gingivitis y caries dental.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales de mayor prevalencia de acuerdo con Global Burden Disease son la caries dental, enfermedad periodontal y edentulismo (NOM-013-SSA2-2015). La caries dental, uno de los trastornos más comunes, después del resfriado común. Suelen aparecer en los niños y en los adultos jóvenes, pero pueden afectar a cualquier persona y son la causa más importante de pérdida de los dientes en las personas más jóvenes.

Las bacterias suelen estar presentes en la boca y convierten los alimentos, especialmente los azúcares y almidones, en ácidos. Las bacterias, el ácido, los residuos de comida y la saliva se combinan en la boca para formar una sustancia pegajosa llamada placa que se adhiere a los dientes y que es más prominente en los molares posteriores, justo encima de la línea de la encía en todos los dientes y en los bordes de las obturaciones. Si la placa que no es eliminada de los dientes se mineraliza y se convierte en sarro. La placa y el sarro irritan las encías, produciendo gingivitis y posteriormente periodontitis.

Las bacterias son esenciales para el desarrollo de una lesión cariosa. El principal microorganismo patógeno en todos los tipos de caries dental es el *Streptococcus mutans*, el cual sintetiza polisacáridos insolubles de la sacarosa, es un formador homofermentante de ácido láctico, coloniza en la superficie de los dientes, es más acidúrico que otros estreptococos.

La gingivitis se debe a los efectos a largo plazo de los depósitos de placa, un material adherente compuesto de bacterias, moco y residuos de alimentos que se desarrolla en las áreas expuestas del diente. La placa es la principal causa de caries dental y, si no se remueve, se convierte en un depósito

duro denominado sarro que queda atrapado en la base del diente. La placa y el sarro irritan e inflaman las encías.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, diariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele O., 1993).

De acuerdo con la WHO (1999) una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplea como drogas en el tratamiento de alguna afección. Debido a su actividad farmacológica, actúan directamente sobre el organismo, produciendo cambios significativos en su funcionamiento (Olivera, et al., 2005).

La planta entera no tiene en si valor medicinal; normalmente los compuestos útiles se concentran en alguna de sus partes; hojas, semillas, flores, cortezas y raíces. Además, no siempre los mejores resultados se obtienen con el uso de las plantas frescas o con preparaciones caseras y por esta razón el hacer extractos de plantas procesadas permite obtener más principios activos que son los que aportan la capacidad terapéutica, las plantas como los aceites esenciales, compuestos químicos y extractos vegetales (Cáseres, 1996).

Por otra parte, *C. texana* es un arbusto leñoso, ramoso espinoso con corteza grisácea y amarga; hojas alternas ovadas o elípticas; flores solitarias rojas o moradas y frutos globosos, pertenece a la familia: Simarubáceas, florece de agosto a septiembre y fructifica de Septiembre a Octubre.

C. texana conocida comúnmente como "chaparro amargoso" ha sido utilizada en México desde hace muchos años para tratar la disentería de tipo amibiano. Se ha utilizado en falta de apetito, fiebre, amibiasis, y como descongestionante.

TEORIA

Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido fotoquímico y a su poco o nulo efecto tóxico (Beg A., 2000). Los productos de las plantas poseen numerosas propiedades farmacológicas, incluyendo además otras propiedades como antimicrobianas, antimutagénicas, antivirales, antimicóticos y entre otras, además son utilizados en el tratamiento de forúnculos, del acné, de la gingivitis, de la candidiasis vaginal y para evitar la formación de placa dental y la habilidad de promover la cicatrización de heridas (Dunsmore, 2001, Chen y Yang, 2003).

a) La caries es quizá la enfermedad más frecuente del hombre. La caries dental es una enfermedad que, en todas las épocas y particularmente, en todo el mundo, muestra una enorme desproporción, en su magnitud, respecto a todas las posibles alteraciones de la salud bucal (MINSAP, 1995).

Entre los factores de riesgo de la enfermedad se encuentran: Alto grado de infección del *Streptococos mutans*, la pobre resistencia del esmalte, el apiñamiento dentario, la experiencia anterior de caries, la mala higiene bucal, la ingestión de alimentos azucarados, entre otros (Rodríguez., 1997). Las dietas ricas en productos refinados como azúcares, pasteles, alimentos muy elaborados facilitan la aparición de caries (Hernández, G. 1998).

La incidencia de caries dental ha experimentado un gran incremento debido a la continua transformación del modo de vida y de alimentación; el cambio de las actividades agrícolas y por lo tanto el empleo de cereales como principio básico de la alimentación, junto con la cocción y los procesos de elaboración de alimentos, han favorecido el aumento de la incidencia de esta enfermedad hasta alcanzar los alarmantes niveles actuales, que según estadísticas representa del 75 al 85 % (Hernández, 1998).

b) La gingivitis es la inflamación o degeneración del tejido de la encía. El tejido que hay entre los dientes se vuelve tumefacto y desigual, se vuelve más oscuro, y la encía sangra con facilidad (Barrón. 2007)

En numerosas investigaciones se plantea que el sangrado gingival puede ser reducido o eliminado por un cuidadoso control de la placa dentobacteriana (Catón, 1988).

La gingivitis en sus inicios es fácil controlarla, basta con una correcta técnica de cepillado y el uso de enjuagues con clorhexidina como coadyuvante para mejorar la higiene y la destrucción de bacterias. La utilización adecuada y regularmente de la caléndula (*Calendula officinalis*) en el

tratamiento de la gingivitis resulta eficaz, ya que disminuye los signos de la enfermedad, como son sangrado, inflamación y coloración de las encías (Machado et al. 2010).

c) *C. texana* constituye una alternativa de tratamiento de esta enfermedad cuando hay resistencia a otros fármacos y además en mujeres con tricomoniasis durante el primer trimestre del embarazo (Calzado C.1998a). Se ha descartado también experimentalmente efecto tóxico de la planta (Calzado C.et al.1998b).

El extracto metanólico de *C. texana*, presenta bajo condiciones axénicas in vitro actividad amebicida sobre *E. histolytica* tanto en el estadio de trofozoito como de quiste o estructura semejante a quiste, presentando 50 veces mayor efectividad que la droga de elección contra *E. histolytica*: el metronidazol (Barrón M.2007).

En un trabajo publicado por un grupo de investigadores mexicanos, concluyen que *C. texana* no tiene ningún efecto citotóxico en cultivos de células humanas diploides normales (Calzado et al., 1995). Por otra parte, el grupo de investigadores de (Osuna *et al.*, 2005) mencionan que *C. texana* presenta un grupo de cuasinoides biológicamente activos, entre ellos chaparrina (principio activo de sabor amargo), el amarolido y castelanolido que son también principios amargos del chaparro amargoso. En la actualidad no existen antecedentes del empleo de extractos de *C. texana* sobre *P. gingivalis*.

d) *A. salina*, es un pequeño crustáceo que vive en lugares con alta concentración de sal (35 g por litro) es decir, salobres, sus huevos protegidos por quistes se incuban a una temperatura de 28 °C y necesita de una oxigenación constante *A. salina* para efectuar estos ensayos, presenta la ventaja de que es un modelo económico y por lo tanto se reduce la cantidad de mamíferos (ratones) que son empleados (Guilhermino et al., 2000).



Ilustración 1. Nauplio de *A. salina*

PARTE EXPERIMENTAL

Castela texana (Procesamiento del material vegetativo)

El material vegetativo de *C. texana*, se procesó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Procesamiento del material vegetal de *C. texana*: Primeramente, se realizó un lavado del material vegetal, eliminando de esta manera cualquier residuo ajeno al material de interés. Después se extendió el material vegetativo dejando secar a temperatura ambiente. Se trituró el material seco empleando un molino de mano y se finalizó con la obtención de los extractos de *C. texana*.

Extractos metanólicos: El material vegetal (70gr) de *C. texana* se colocó en un matraz y se les agregó 350 mL de metanol. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por siete (7) días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No.2. El filtrado se dejó evaporar hasta secar a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto mediante raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio hasta su uso.

Tamizaje químico parcial: A cada extracto se le realizaron pruebas de identificación química. El extracto obtenido en cada planta se sometió a pruebas de identificación química.

Aislamiento: Las cepas fueron recolectadas de pacientes con problemas de caries dental y gingivitis. Las cepas se mantienen en el cepario del Laboratorio de Biología Celular en refrigeración y cada que se requiera la cepa se activa en caldo de cultivo MPT-T por 24 h a 37°C y este procedimiento se realiza por tres días.

Cinética de crecimiento: utilizando 9 tubos con caldo de cultivo con un volumen de 10 mL y un inóculo de 30 µL de bacterias, se incubaron a 37°C, se determinó la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro durante 24 hs .

Posteriormente se llevó acabo la evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de hoja, tallo y corteza de *C.texana* sobre el crecimiento axénico in vitro de bacterias relacionadas a caries dental y gingivitis.

Método turbidimétrico: Para realizar el bioensayo de los diferentes extractos metanólicos de *C. texana* (tallo, hoja y corteza), en 72 tubos de 13X100mm conteniendo ocho (8) mL de medio de cultivo, se les adicionó las distintas concentraciones que se realizaron de los extractos de la planta a evaluar, cada tubo se inoculó con 30 µL de bacterias relacionadas a caries dental y gingivitis, durante 24 h se leyó cada tubo en un espectrofotómetro a 635nm.

Técnica de recuento bacteriano en placa: a los 72 tubos de 13x100mm que se les realizó el método turbidimétrico se utilizaron diferentes diluciones a cada uno de los extractos metanólicos de *C. texana* (tallo, hoja y corteza) a las concentraciones de las dosis (0.1, 1 y 10 mg/mL) de 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ y 10⁻¹²; para realizar las diluciones se utilizaron tubos de 13x100mm con 9 mL de solución salina al 0.85% y se les agregó 1mL de la mezcla de bacterias y los diferentes extractos de *C. texana* con las diferentes dosis; ya realizadas las diluciones mediante la técnica de vertido en placa, se les agregó 1mL de las diluciones de los diferentes extractos metanólicos de *C. texana*, posteriormente a las cajas petri se les agregaron 15 mL de agar MPT-T en condiciones de estériles, se mezcló 8 veces en forma de 8 y se dejó solidificar el agar a temperatura ambiente, enseguida fueron incubadas a 37°C por 24 h, posteriormente se contaron las colonias.

Determinación de toxicidad de los extractos sobre *A.salina*: Se incubaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantienen en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantiene iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. A las 24 h, los nauplios son colocados con la ayuda de una micropipeta a otro recipiente y se mantuvieron en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 h. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 100 µL de la suspensión de nauplios/pozo (aproximadamente 10 nauplios) más 100 µL de las diluciones de los extractos a evaluar. A las 24 h de ser aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizaron el conteo de nauplios vivos por dosis.

RESULTADOS

Identificación de grupos funcionales a través de pruebas coloridas presentes en los extractos metanólicos de *Castela texana*.

Grupo funcional	Prueba bioquímica	Extracto metanólico de		
		Tallo	Hoja	Corteza
Insaturaciones	KMnO ₄	-	+	-
Grupo carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	+
Oxhidrilos fenólicos	FeCl ₃	+	+	-
Esteroles y triterpenos	Liebermann-Burchard	+		
	Salkowski	+	+	+
Carbohidratos	Molish	+	+	+
	Cumarinas	+	-	+
Lactonas	Lactonas	+	+/-	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	A +	A -	A -
		B+	B-	B+
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Flavonas	Flavonoles	Flavonas
Alcaloides	Dragendorff	A +	A -	A +
Saponinas	Bicarbonato de sodio	+	+	+
	Salkowski	+/-	+/-	+
Aromaticidad	Ácido Sulfurico-formaldheido	+	+	+

Tabla 1. Los resultados de las pruebas químicas para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en extractos de hoja, tallo y corteza, se presentación en la

Cinética de crecimiento: La cinética de crecimiento de la bacteria relacionada a gingivitis en medio MPT.

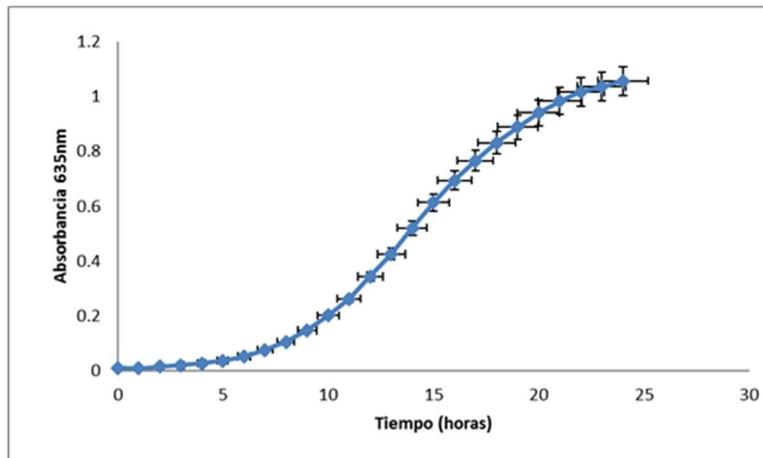


Gráfico 2. Cinética de crecimiento de la bacteria relacionada a gingivitis. Observación de una fase de adaptación de 3 h, y posteriormente un crecimiento logarítmico desde las 7 h hasta las 22 h. Cada punto graficado representa el promedio de tres eventos independientes por triplicado

En la cinética de crecimiento de la bacteria relacionada a caries dental en medio MPT-T se muestra en la Gráfica. 3, en la cual se observa una fase de adaptación de 3 horas y posteriormente un crecimiento logarítmico desde las 10 h hasta las 15 h, y posteriormente se observa la fase estacionaria. Cada punto graficado representa el promedio de tres eventos independientes por triplicado.

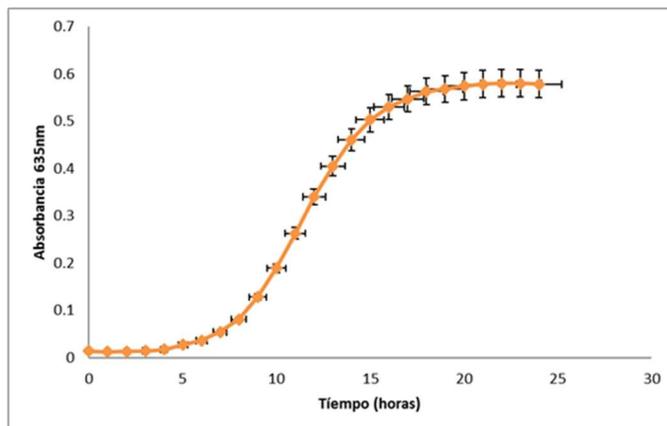


Gráfico 3. Cinética de crecimiento de la bacteria relacionada a caries dental

Método turbidimétrico: Al evaluar la actividad biológica de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo de *C. texana* sobre las bacterias relacionadas a gingivitis Fig. 4 y caries dental Fig. 5, observamos una marcada inhibición del rendimiento celular de las bacterias relacionadas a gingivitis y caries dental en presencia del extracto metanólico de tallo, hoja y corteza de *C. texana* al emplear 0.1 mg/mL, 1mg/mL y 10mg/mL de cada extracto, estos resultados indican la capacidad inhibitoria de los extractos metanólicos de corteza, hoja y tallo sobre las bacterias relacionadas a caries dental y gingivitis.

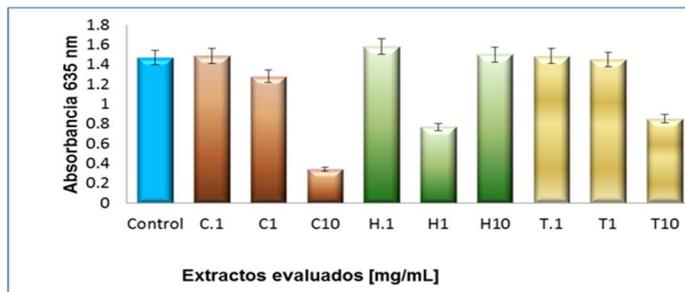


Gráfico 4. Gráfica comparativa de la actividad biológica de los extractos de *C. texana* sobre bacterias relacionadas con gingivitis (C=corteza, H=hoja y T=tallo)

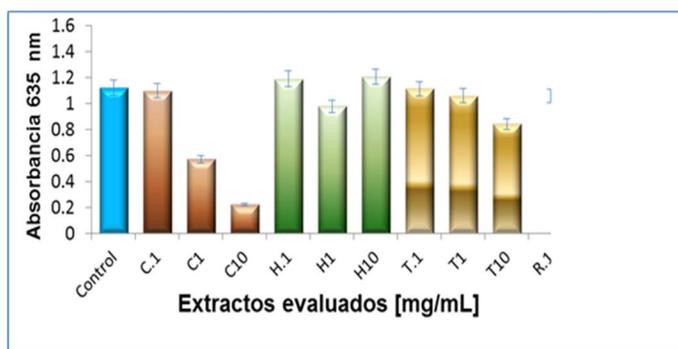


Gráfico 5. Gráfica comparativa de la actividad biológica de los extractos de *C. texana* sobre bacterias relacionadas a caries dental (C=corteza, H=hoja y T=tallo)

Recuento bacteriano en Placa (UFC/mL): El método directo de cuantificar la actividad biológica de los extractos metanólicos de *C. texana* sobre las bacterias relacionadas a gingivitis (Tabla 6) y caries dental (Tabla 7) se determinó mediante la técnica de recuento en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonia, en donde podemos observar que la mejor actividad biológica de *C. texana* es la hoja a una dosis de 1mg/mL en las bacterias relacionadas a gingivitis, mientras que en la caries dental fue de 10mg/mL.

	Control	0.1mg/mL	1mg/mL	10mg/mL
	(UFC/mL)			
Corteza	830,000,000	Incontables	6,850,000	490,000
Hoja		299,550	210,000	380,000
Tallo		Incontables	3,200,000	8,650,000

Tabla 6. Determinación de UFC/mL de bacterias relacionadas a gingivitis

	Control	0.1mg/mL	1mg/mL	10mg/mL
	(UFC/mL)			
Corteza	178,000,000	Incontables	179,500	Incontables
Hoja		89,000	32,500	7,900
Tallo		Incontables	Incontables	245,000

Tabla 7. Determinación de UFC/mL de bacterias relacionadas a caries

Toxicidad sobre nauplios de *A. salina*: La actividad tóxica de los extractos metanólicos de tallo, hoja y corteza de *C. texana* fue evaluada sobre los nauplios de *A. salina*. Con los resultados obtenidos se calculó la DL50 (Dosis letal media) de cada uno de los extractos, se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17.

Extracto metanólico de:	DL50 µg/MI
Corteza	187.427
Hoja	53.420
Tallo	174.057

Figura 8. Determinación de la DL50 µg/mL de los extractos metanólicos de *C. texana* sobre *A. salina*

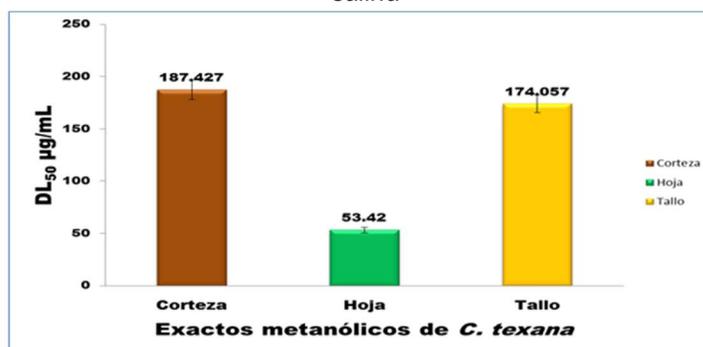


Gráfico 9. Comparación de las concentraciones (µg/mL) de los extractos metanólicos de tallo, hoja y corteza de *C. texana* necesarias para obtener la DL50 sobre *A. salina*.

CONCLUSIONES

Dentro de las pruebas realizadas para conocer la capacidad del extracto metanólico de *Castela texana*, las pruebas colorimétricas indican que el extracto metanólico de la hoja fue el único que presentó insaturaciones con la prueba de $KMnO_4$ y así para flavonoles con la prueba H_2SO_4 . El método turbidimétrico o presuntivo indica que a concentraciones de 10mg/mL el extracto del tallo presentó la mayor actividad biológica, tanto para bacterias relacionadas a la caries dental y a gingivitis, mientras que, en el recuento bacteriano en placa, los extractos a base de hoja presentaron mayor actividad biológica en el caso de bacterias relacionadas a la gingivitis a concentraciones de 1mg/mL y para el caso de caries a concentraciones de 10mg/mL. Los resultados obtenidos indican que el extracto metanólico de la hoja de *Castela texana* presenta actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de dos cepas relacionadas a gingivitis y caries dental.

REFERENCIAS

1. Akerele O., (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar . Foro Mundial de la Salud.14:390-395
2. Barrón González, M.P., (2007). Inducción *in vitro* del ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* e inhibición de su diferenciación. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL
3. Beg A., (2000). Effect of *Plumbago zelanica* extract and certain curing agent on multidrug resistant bacterias of clinical drugs. Word Journal of Microbiology and Biotechnology.16: 841-864.
4. Cáseres A. (1996). Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Edicion Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 43-47

5. Calzado Flores, C. (1998a). *In vitro* anti-trichomononic activity of *Castela texana*. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 41:173-74.
6. Calzado Flores, C. M.B. Hurtado-Ramírez, Z. Villanueva, M.J. Verde-Star, J.J. Segura-Luna. (1998b). Preliminary acute toxicological study of *Castela texana*, Proceedings of the Western Pharmacology Society. 41:77-78.
7. Calzado Flores C., Segura Luna J.J. Guajardo Touché E.M. (1995). Effects of chaparrin, nordihydroguaiaretic acid and their structural analogues on *Entamoeba histolytica* cultures. Proceeding of the Western Pharmacology Society. 38:105-6.
8. Catón J., (1988). Cell populations associated with conversion from bleeding to non bleeding gingiva. Journal of Periodontology. 59:7-10.
9. Chen, X. y L.Yang. (2003). Shikanin, a component of chinese herbal medicine, Inhibits chemokine receptor. Function and suppresses human immunodeficiency virus Type 1. Antimicrob Agents Chemother. 47(9): 2810-2816.
10. Dunsmore, K.E., P.G. Chen, (2001). Curcumin, A medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response "Crit Care Medical. 29(11):2199-204
11. Guilhermino L, Diamantino T, Silva MC y Soares AM., (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? Ecotoxicology and Environmental Safety, 46:357-362.
12. Hernández G. (1998). Cuide su boca. Editorial Everest, S.A. Impreso en España.
13. Machado M.A., Contar CM, Brustolim JA. Candido L., Azevedo-Alanis LR, Gregio AM, Trevilatto PC, Soares de Lima AA., (2010). Management of two cases of desquamative gingivitis with clobetasol and *Calendula officinalis* gel. Biomed Paper Medical. Fac. Univ. Palacky Olomouc Csech Repub. 154(4):335-8.
14. MINSAP, Ministerio de Salud Pública de Cuba, 1995
15. NORMA Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-2015, Para la prevención y control de enfermedades bucales.
16. Olivera Miranda, María A; Velázquez, Dilia y Bermúdez, Alexis. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América. 30:453-459.
17. Osuna L., Tapia M., Aguilar A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Barcelona, España: Publicaciones y ediciones de la universidad de Barcelona, pp.55 y 56.
18. Rodríguez Calzadilla A. (1997). Enfoque de riesgo en la atención estomatológica risk approach in dental care. Revista Cubana Estomatológica. 34(1):40-49
19. World Health Organization (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization Geneva. 1:95-102

ANÁLISIS DE FACTORES PARA ELABORACIÓN DE UNGÜENTO PARA ALIVIAR QUEMADURAS DE PRIMER GRADO

Rubí Alcalá González¹, Claudia Sánchez Ibarra¹, Javier Zertuche Garza¹, Valeria Estefanía Díaz Salazar², Eva Sarahi González Niño², Sara Monserrath Ramírez Guerrero², Paulina Anahí Ramírez Guerrero², Paulina Yutani Martínez².

¹Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de la Región Carbonífera, ²Alumno del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de la Región Carbonífera
rubialcala@hotmail.com

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo determinar las variables óptimas para el proceso de la elaboración de un ungüento para tratamiento de quemaduras leves o superficiales, esto se realizó por la necesidad de ayudar a las personas que sufrieron quemaduras leves y que querían sanar utilizando ingredientes naturales como la miel virgen de abeja, las hojas de moringa oleífera y el aceite de coco, la pregunta a resolver fue ¿Cuáles son las variables óptimas para obtener mayor rendimiento en gramos del ungüento para tratamiento de quemaduras leves o superficiales?; Para esto, fue necesario conocer las características óptimas para producirlo, utilizando modelos estadísticos específicamente análisis de varianza y diseño de experimentos con el arreglo ortogonal L_{42^3} (Escalante, 2007), para analizar las variables de entrada, que fueron miel virgen de abeja, aceite de coco y las hojas de moringa oleífera, y el impacto en la variable de respuesta la cual fue el rendimiento en gramos del ungüento. Con la investigación se obtuvieron las condiciones óptimas son $A_1 B_1 C_1$, que son elaborar el ungüento con miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y añadir el aceite de coco durante el proceso. En el modelo de predicción de condiciones óptimas se aprecia que, al elaborar el ungüento con miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y Añadir el aceite de coco durante el proceso se obtiene la cantidad de 55.5 gramos. También se obtuvo en el análisis de varianza que con un nivel de confianza del 95 % y con $F_{.05(1,4)} = 7.71$ que se acepta la hipótesis nula en las 3 fuentes de variación: Miel de abeja, Aceite de coco y Hoja moringa oleífera que nos dice que las medias son iguales. Otro hallazgo importante al realizar las pruebas fue la importancia de añadir el aceite de coco durante el proceso, ya que este factor le ayudó a darle más consistencia al ungüento al momento de aplicarlo en la piel. El diseño de Experimentos es una metodología excelente para realizar pruebas y poder replicarla por la comunidad científica.

INTRODUCCIÓN

En este estudio se desarrolla una investigación científica en la que a través de actividades basadas en un proceso sistemático, organizado y experimental utilizando el diseño de experimentos del Método Taguchi y el Análisis de varianza de tres factores y dos niveles para cumplir con el objetivo para las condiciones ideales en elaborar un ungüento para tratamiento de quemaduras de primer grado (leves o superficiales) (Schaefer & ., 2019) utilizando ingredientes naturales, como lo son: Miel virgen de abeja, aceite de coco y las hojas de moringa oleífera, y el impacto en la variable de salida la cual es el rendimiento en gramos del ungüento.

Para llegar a lo anterior nos dimos a la tarea de investigar que productos de origen natural tienen beneficios para la piel y cuales estaban obviamente 100% comprobados de que servían, después de mucha búsqueda encontramos que la miel era un producto que ayuda a sanar a la piel con las propiedades naturales de las abejas, plantas y la miel en sí, debido a que la miel tiene una consistencia pegajosa, nos dimos a la tarea de buscar otro ingrediente que disminuyera su viscosidad y encontramos el aceite de coco, debido a que su consistencia varía de acuerdo a su temperatura y también cuenta con propiedades para la protección de los rayos UV (Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU., 2019), por último pero no menos importante uno de los productos de este ungüento son las hojas de moringa oleífera, ya que tiene un número de vitaminas, minerales y antioxidantes excelentes para el ser humano.

TEORÍA

A la miel le han sido atribuidas propiedades curativas desde la antigüedad. De acuerdo con varios estudios se ha determinado que la miel tiene características antibacterianas y estimulantes en el proceso de cicatrización, así como en el tratamiento de úlceras y heridas. Cuando la miel es aplicada sobre una herida la glucosa oxidasa produce localmente una liberación lenta de peróxido de hidrógeno. La miel ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de heridas y quemaduras. La miel pura sin procesar ni esterilizar ha sido utilizada sin ninguna reacción adversa ni caso alguno de botulismo. El uso de miel puede ser una alternativa a las terapias tradicionales, aunque se necesita realizar grandes estudios comparativos entre miel y otros tratamientos. Al tratarse de un producto natural, económico y presente en casi todas las culturas, su utilización en los países del llamado tercer mundo podría ser muy beneficiosa. Se expone el caso clínico de una paciente en la que se utilizó miel pura en el tratamiento de varias úlceras por presión (UPP) con buenos resultados. (Gascón, 2004)

La Moringa es una planta originaria de India, el «árbol milagro» Moringa oleífera lleva ya varios siglos como parte de la horticultura tradicional del trópico seco mexicano, donde se cultiva principalmente para fines ornamentales. Con el reconocimiento reciente de sus propiedades nutritivas, farmacocinéticas e industriales, existe un creciente interés en fomentar su cultivo en México. Presenta un alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes que le confieren cualidades sobresalientes en la nutrición y salud humana (Olson & Alvarado-Cárdenas, 2016)

El aceite de coco deriva de es la nuez (fruto) de la palma de coco. El aceite de la nuez se utiliza para hacer medicina. Algunos productos de aceite de coco se conocen como aceite “virgen” de coco. A diferencia de lo que sucede con el aceite de oliva, en la industria no existe un estándar para el significado de aceite “virgen” de coco. El término ha llegado a significar que el aceite es generalmente aceite sin procesar. El aceite virgen de coco, por ejemplo, por lo general no ha sido blanqueado, desodorizado o refinado. El aceite de coco a veces se aplica a la piel como una crema hidratante, para la salud neonatal y para tratar el eccema (dermatitis atópica) y una condición llamada psoriasis. De acuerdo con el programa de acción específico prevención de accidentes en grupos vulnerables 2013-2018 Coahuila, las quemaduras son uno de los accidentes más frecuentes en los coahuilenses. Después de saber dicha información, surgió una duda ¿Qué utilizara la gente en caso de sufrir tal accidente? Muchas respuestas salieron después de tal pregunta: pomadas farmacéuticas tales como, Vitacilina, pomada de la campana, bactroban e incluso personas respondieron medicamentos para animales, en otros casos la gente respondió con remedios caseros, mostaza, huevo, vinagre, entre otros (Yun Ok, Ju-Young Jung, & Donghwan, 2016). Es así como nace la necesidad de un ungüento creado para aliviar molestias producidas por quemaduras de primer grado para ayudar a quienes llegan a sufrir este tipo de quemaduras y quieren una solución buena, bonita y barata.

Método Taguchi

Un experimento es un procedimiento mediante el cual se trata de comprobar (confirmar o verificar) una o varias hipótesis relacionadas con un determinado fenómeno, mediante la manipulación y el estudio de las variables que presumiblemente son su causa. Se utiliza para describir cualquier proceso que genere un conjunto de datos

El (DOE) se puede definir como un conjunto de técnicas estadísticas usadas para planear experimentos y analizar sus resultados de manera ordenada y eficiente.

Existen tres principios básicos a ser considerados en todo diseño y análisis de un experimento:

1.- El orden de los experimentos debe ser aleatorio. Aleatorizar el orden de las pruebas neutraliza fuentes de variación que pueden estar presentes durante el experimento. En general dichas fuentes de variación son desconocidos, y pueden ser muchos, por ejemplo, cansancio del trabajador durante la realización de las pruebas o durante la medición de estas, cambios de voltaje, cambios de humedad, etc.

2.- Es importante replicar cada experimento. La razón es obtener un estimado del error, tanto para ver qué tan bien el diseño representa al proceso, como para poder comparar los factores y determinar si son activos o no. Se define como replica genuina la obtenida en una sola prueba o medición para cada combinación de los factores, y repetir dichas condiciones para cada replica adicional, en lugar

de tomar varias muestras o mediciones de una vez en cada combinación. Lo opuesto a las réplicas genuinas son las repeticiones. Por supuesto las réplicas genuinas implican un mayor tiempo al realizar pruebas y un costo mayor, pero es la mejor manera de obtener un estimado más preciso.

3.- Ocasionalmente pueden existir variables presentes en un experimento, cuyo efecto no se desea probar y que incluso pueden afectar o encubrir la influencia de las variables con las que se desea experimentar.

Pasos para la experimentación:

- Definir el problema
- Seleccionar la variable de respuesta
- Verificar el estado de las maquinas en donde se va a experimentar
- Verificar la capacidad y estabilidad de los instrumentos de medición
- Seleccionar las variables a experimentar y sus niveles
- Determinar el tipo de diseño a usar y el número de replicas
- Realizar las pruebas aleatoriamente
- Analizar los resultados
- Conclusión

Factores o variables

Son dimensiones medibles en una escala continua. Por ejemplo, presión, voltaje, temperatura, diámetro, peso, etc.

Los niveles de una variable son los valores en los cuales se experimentará con esta.

Sin embargo, también variables cualitativas proveedor, operador, etc.

Elementos del método Taguchi

Los arreglos ortogonales (AO) son matrices de diseño que indican el número de pruebas y las combinaciones de las variables y sus niveles en dichas pruebas. Los AO representan una fracción del total de experimentos por realizar, de acuerdo con el número de variables y sus niveles. Por ello, la utilización de los AO reduce el costo y el tiempo de la experimentación. Los AO son diseños fraccionados.

La mayoría de los AO están asociados a una o varias gráficas lineales que indican la ubicación de las variables y sus interacciones dentro del AO seleccionado. (Escalante, 2007)

Para hacer una selección de arreglos ortogonales se requiere:

1. Escoger el AO considerando que cada columna de un arreglo con dos niveles puede alojar a una variable con dos niveles, o a una interacción formado por variables de dos niveles. En el caso de arreglos de tres niveles, se necesitarán dos columnas para contener a una interacción formada por variables con tres niveles.
2. Dibujar la gráfica requerida
3. Buscar una gráfica lineal que se adapte a la gráfica requerida
4. Asignar las variables del arreglo (Escalante, 2007)

Un arreglo ortogonal se puede comparar con una replicación factorial fraccionada, de manera que conserva el concepto de ortogonalidad y contrastes. Un experimento factorial fraccionado es también un arreglo ortogonal. Taguchi desarrolló una serie de arreglos particulares que denominó: $L_n(a^k)$ Donde: n = representa el número de pruebas (renglones), k = esto es el número de columnas o condiciones experimentales (factores). a = Representa los diferentes niveles a los que se tomará cada factor (g-taguchi, 2019).

PARTE EXPERIMENTAL

Población

La muestra es de 4 pruebas con 2 réplicas cada una.

Tipo de estudio

De acuerdo con las estrategias

Documental: Esta investigación se clasifica en este tipo de estudio, ya que se partió de información recabada de documentos que ya han sido escritos por personas con conocimiento sobre el tema.

Experimental: Primeramente, se analizó la situación actual del ungüento se midió su variable de salida, Se preparó el diseño del experimento y se analizaron por herramientas estadísticas.

Los datos obtenidos de la investigación son reportados en gramos.

De acuerdo con el periodo en que se realiza el estudio

Retrospectivo parcial: Esta investigación es el tipo de estudio que cuenta con una parte de la información y otra por obtenerse.

De acuerdo con el tiempo

Investigación sincrónica: Ya que se realiza en cierto momento y en el tiempo necesario para completar toda la información.

Por la evolución del fenómeno en estudio

Transversal: Ya que es una investigación sobre un problema durante un periodo específico.

Por la interferencia del investigador en el estudio

Experimental. El investigador tiene el control de las variables del fenómeno en estudio.

Selección de instrumentos de investigación

Las técnicas de investigación utilizadas para obtener la información requerida de los elementos involucrados en el experimento es la observación al momento de realizar las pruebas y recopilación de la información obtenida. Para la medición del peso es utilizada una báscula con unidades de medida en gramos.

Plan de recolección de información

Nuestra manera de documentar información fue buscar en internet en diferentes páginas, para tener un marco teórico, y posteriormente llevar a cabo el diseño de experimentos del Dr. Genichi Taguchi para encontrar el rendimiento, cabe mencionar que existe muy poca información al respecto.

Plan de análisis de datos

Una vez que hayamos determinado la muestra y elaborado el diseño del experimento. Continuaremos con la recolección de datos, iniciaremos las pruebas y posteriormente el análisis de datos. Nuestro análisis requiere la comprobación de la siguiente hipótesis: "El rendimiento en gramos del ungüento depende del tipo de miel, estado de las hojas de moringa y momento de añadir el aceite de coco", Al iniciar las pruebas se procede a realizar la recopilación de datos de acuerdo con el diseño de experimentos, documentar la información, analizarla e interpretarla para conocer las condiciones ideales de miel de abeja, momento de añadir el aceite de coco y hojas de planta moringa oleífera para obtener las condiciones óptimas de rendimiento en gramos del ungüento. En la figura 1 podemos ver el proceso de elaboración del ungüento.



Figura 1. Proceso de elaboración del ungüento

Planteamiento del Problema

Diseño de Experimentos. Los datos de la tabla 1 muestra las variables y los niveles de manipulación, la tabla 2 muestra las pruebas efectuadas con el arreglo ortogonal: L_42^3 , en la tabla 3 se observan las respuestas del análisis regular, también se puede ver en la tabla 4 un análisis de varianza con un modelo lineal general para comprobar la hipótesis de que el rendimiento en gramos del ungüento depende del tipo de miel, estado de las hojas de moringa oleífera y el momento de añadir el aceite de coco. Se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

Las variables de entrada y salida que se van a analizar se muestran en la figura 2:

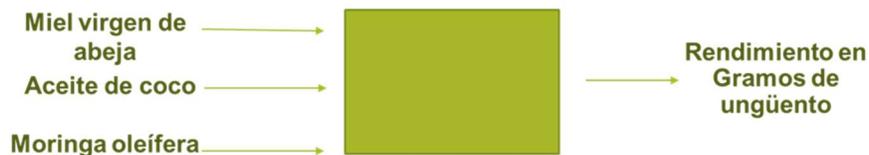


Figura 2. Variables de entrada y de salida

Característica de Calidad: Nominal es mejor: 55 gr.

Variables de entrada	1	2
Miel	Pura	Con azúcar
Hojas de Moringa oleífera	Seca	Fresca
Aceite de coco	Añadir durante el proceso	Añadir después del proceso

Tabla 1. Tabla de variables y niveles

RESULTADOS

Resultado: Como se observa en la tabla 3 de respuestas y en la figura 3 gráfica de efectos principales de medias, las condiciones óptimas son $A_1 B_1 C_1$, que son miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y añadir el aceite de coco durante el proceso.

Prueba	1	2	3	Y_1	Y_2	Y_T	
1	1	1	1	54.9	56.1	55.50	
2	1	2	2	52.1	55.0	53.55	
3	2	1	2	53.3	54.5	53.90	
4	2	2	1	54.8	53.7	54.25	
Total						217.20	$Y = 54.30$

Tabla 2: Arreglo ortogonal: L_{42^3}

Gráfica Lineal

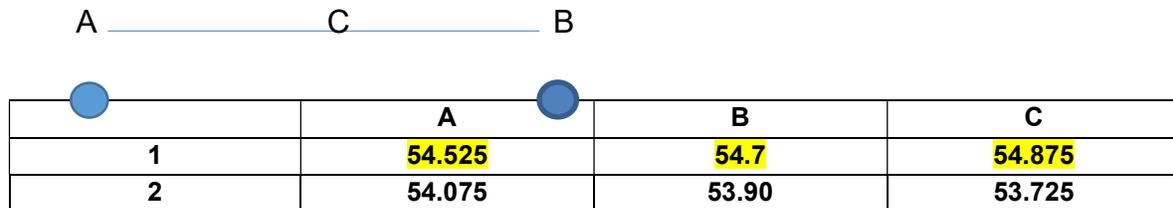


Tabla 3. Respuestas de análisis regular

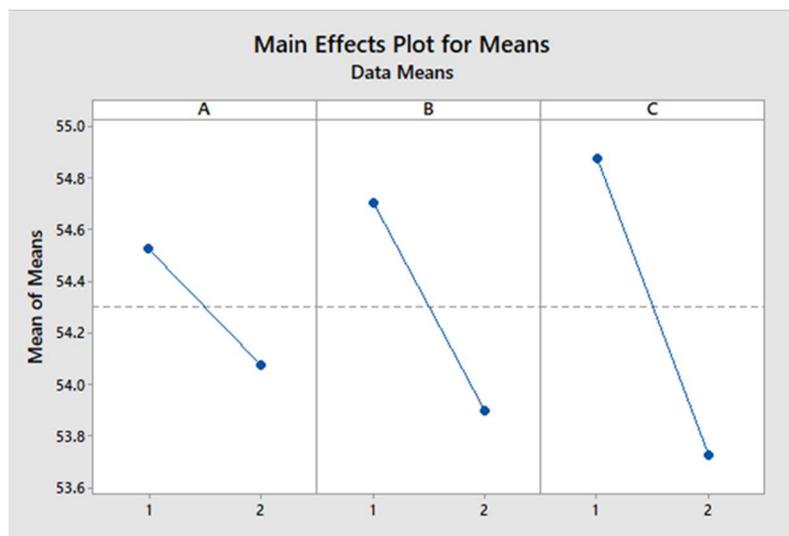


Figura 3. Gráfica de efectos principales de medias

Resultado: Como se puede observar en la tabla 4 análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % y con $F_{.05 (1,4)} = 7.71$ Se Acepta la Hipótesis nula en las 3 fuentes de variación: Miel de abeja, Aceite de coco y Hoja moringa oleífera que nos dice que las medias son iguales

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad	S^2	F calculada
A	0.405	1	0.405	0.26
B	1.280	1	1.280	0.82
C	2.645	1	2.645	1.69
e	6.250	4	1.562	
T	10.58	7		

Tabla 4. Análisis de varianza

H_0 = Todas las medias son iguales

H_a = Hay diferencia entre las medias

Resultado: En el modelo de predicción de condiciones óptimas se aprecia que, al elaborar el ungüento con miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y Añadir el aceite de coco durante el proceso se obtiene la cantidad de 55.5 gramos.

Modelo de predicción de condiciones óptimas

$$\hat{y} = -2\bar{y} + A_1 + B_1 + C_1$$

$$\hat{y} = -2(54.30) + 54.525 + 54.7 + 54.875$$

$$\hat{y} = 55.5$$

RESULTADO GENERAL

Como se observa en las pruebas del diseño de experimentos efectuadas utilizando un arreglo ortogonal L_{42^3} , en la tabla 3 de respuestas y en la figura 3 gráficas de efectos principales de medias, las condiciones óptimas son A_1 , B_1 y C_1 , que son elaborar el ungüento con miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y Añadir el aceite de coco durante el proceso. En el modelo de predicción de condiciones óptimas se aprecia que, al elaborar el ungüento con miel de abeja virgen, hojas de moringa oleífera deshidratada y Añadir el aceite de coco durante el proceso se obtiene la cantidad de 55.5 gramos. También se obtuvo en la tabla 4 análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % y con $F_{.05(1,4)} = 7.71$ que se Acepta la hipótesis nula en las 3 fuentes de variación: Miel de abeja, Aceite de coco y Hoja moringa oleífera que nos dice que las medias son iguales. En la figura 4 podemos ver el ungüento para aliviar quemaduras de primer grado.



Figura 4. Ungüento para aliviar quemaduras de primer grado

CONCLUSIONES

Se recomienda continuar con la investigación en su segunda etapa para seguir analizando las variables de entrada y ver el impacto en otras variables de salida utilizando experimentos debidamente preparados, así como realizar análisis químicos al ungüento.

El estudio tiene un enfoque natural, alejarse de los medicamentos y presentar una alternativa funcional que no sea tan cara y que ayude igual como lo haría un fármaco. Aunque los ingredientes naturales que contiene el producto son utilizados como remedios caseros para quemaduras, se agrega el valor de combinarlos en forma de ungüento para facilitar su aplicación.

El diseño de Experimentos es una metodología excelente para realizar pruebas y poder replicarla por la comunidad científica

BIBLIOGRAFÍA

1. *Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU.* (29 de Abril de 2019). Obtenido de Medline Plus: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/1092.html>
2. Escalante, E. J. (2007). *Seis Sigma, Metodología y Técnicas*. Limusa.
3. Gascón, R. G. (2004). Actualización sobre el uso de miel en el tratamiento de úlceras y heridas. Caso clínico. *Enfermería Global*, Volumen 3 Num. 1.
4. g-taguchi. (2019 de 2019). <https://www.coursehero.com>. Obtenido de <https://www.coursehero.com/file/54729725/g-taguchidocx/>
5. Olson, M. E., & Alvarado-Cárdenas, L. (2016). Donde cultivar el árbol milagroso, Moringa oleífera, En México. *Revistaa Mexicana de Biodeiversidad*, <http://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/viewFile/1367/1328>.

6. Schaefer, T. J., & ., K. D. (14 de Febrero de 2019). *Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. Institutos Nacionales de Salud*. Obtenido de Stat Pearls: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430741/>
7. Yun Ok, K., Ju-Young Jung, & Donghwan, C. (23 de Marzo de 2016). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28773340>

DETERMINACIONES BIOQUÍMICO- CLÍNICOS DE 3 ANALITOS EN ANIMALES EN CAUTIVERIO.

Lorena Garcia Diaz, Ana Elisa Guzmán Campos, Francisco Alejo Iturvide, Maria Azucena Márquez Lucio.

Tecnologico Nacional de México, Campus Irapuato.
lorena_grey@outlook.com

RESUMEN

En la actualidad existe una gran diversidad de especies, razas, sistemas de alimentación y manejo en animales en cautiverio, lo cual hace que la interpretación de un estándar bioquímico-clínico para animales pueda representar dificultades en la actualidad. Las determinaciones bioquímico-clínicas sirven como fuente de referencia dentro de la comunidad de animales en cautiverio, ya que, al proporcionar información directamente relacionada con el estado de salud, pueden ser detectados desajustes fisiológicos relacionados con algún padecimiento. Con este proyecto se muestra una propuesta de método y equipos para la cuantificación de 3 parámetros bioquímicos (Colesterol, Magnesio y Calcio) a partir de muestras biológicas sanguíneas (plasma) de animales elegidos aleatoriamente de los cuales se obtuvieron datos básicos e imprescindibles para el manejo clínico de los animales. La valoración en este proyecto fue mediante una comparación de 2 diferentes equipos de lecturas; los cuales son un Espectrofotómetro UV-Visible y el analizador bioquímico EMP-168; con la finalidad de tener resultados confiables y sostenibles en diferentes campos utilizados, obteniendo como resultado que el Colesterol fue el analito más estable y el Calcio por su parto fue el más inexacto a comparación de los valores de referencia proporcionados a la literatura, gracias a estos resultados los animales se clasificaron en animales sanos y animales con deficiencias y/o enfermedades. Algunas muestras se encontraron fuera de rango lo que podría atribuirse a variaciones debidas a las condiciones de vida como posibles aspectos técnicos, por lo que se recomiendan más estudios para lograr determinar la fuente de variación si es propia de la condición y si son correctas o si se debe corregir aspectos en la determinación de tal forma que las mediciones obtenidas se puedan utilizar como referencia en los laboratorios clínicos veterinarios.

Palabras clave: Parámetros, cautiverio, bioquímico, espectrómetro.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen lugares donde se mantienen a los animales en cautiverio en los cuales se encargan de su bienestar, por ello como herramienta de apoyo para el conocimiento de su estado de salud es importante el estudio de los parámetros clínicos. Las pruebas de laboratorio permiten usualmente confirmar o descartar un diagnóstico presuntivo (Sodikoff, 2001).

La base del diagnóstico clásico es “ver, palpar y escuchar”, pero actualmente la mejor aspiración del estudio clínico es reconocer una enfermedad en la forma más eficiente que sea posible; las pruebas de laboratorio proporcionan valiosos pilares diagnósticos, especialmente cuando los hallazgos clínicos son vagos y poco sustentados (Bush, 1999).

El cuadro clínico variará según el momento evolutivo de la enfermedad y muchas veces coexistirán simultáneamente dos o más afecciones. Algunas pruebas de laboratorio útiles para patologías humanas no resultarían confiables al aplicarlas en animales (Marquez, 2004). Para ello, es importante tener conocimiento de los valores de referencia de cada especie, para cada edad y sexo, así como estar enterado de las variaciones propias de las diferentes patologías de la medicina interna (Fuente, 2013). Algunas de las limitantes como el crecimiento, gestación, lactancia o envejecimiento deberían de ser un parámetro fundamental para tomar en cuenta para el estudio de cada especie por análisis clínicos (Kolb, 1987).

TEORÍA

El laboratorio clínico es un lugar en el cual se tiene como objetivo brindar un apoyo primordial al área médica, ya que cuenta con una gran diversidad de procedimientos de los cuales se obtiene una documentación del estado de salud. Por lo cual lo hace una herramienta indispensable para la toma de decisiones respecto a procedimientos médicos (Lamping, 2014)

La calidad y utilidad de los análisis de laboratorio dependen de la manera en la que se manejen las muestras, para esto es necesario seguir las indicaciones, ya que un mal manejo o descuido puede hacer que la muestra se deteriore o simplemente se pierda (Lamping, 2014).

El perfil químico tiene como objetivo analizar cierto tipo de sustancias que están presentes en la sangre, así como dar información sobre el estado de los diferentes órganos (Rodríguez, 2013). Ayuda a evaluar el estado clínico del organismo sobre el funcionamiento de los riñones, hígado, glándulas adrenales, páncreas y algunas presencias de tipos de tumores.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se dividió en 2 fases: pre analítica y analítica, para poder abarcar todas las dimensiones que conlleva el análisis bioquímico-clínicos en animales mantenidos en cautiverio.

Fase pre analítica: en esta fase se eligieron animales. Los animales utilizados en este proyecto fueron caninos los cuales tienen una localización en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, con un estado de salud aleatorio de los cuales se obtuvo una muestra sanguínea la cual se le dio una adecuada identificación (cada muestra debe estar debidamente identificada, debe contener los datos del paciente, especie y prueba, datos de la muestra, fecha, hora, conservante utilizado) y transportación.

Fase analítica: las muestras sanguíneas fueron seleccionadas como objeto de estudio, las cuales fueron proporcionadas en tubos vacutainers con citrato de sodio. Dichas muestras fueron aleatoriamente seleccionadas y tomadas por un equipo certificado del lugar y proporcionadas para el estudio. Se obtuvo plasma por centrifugación (3,000 rpm/ 15 min) para el uso en las mediciones utilizando kits colorimétricos comerciales de la marca Wiener lab, de los cuales se siguió la metodología descrita por el fabricante (Tabla 1).

Los análisis bioquímicos- clínicos se realizaron con el espectrofotómetro de UV-Vis y el analizador bioquímico EMP-168.

Tabla 1. Instrucciones de uso de kits reactivos marco Wiener lab.

Colesterol	Blanco	Estándar	Desconocido
Estándar	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
Incubar 20 min a temperatura ambiente (25°C). El color de reacción final es estable por 30 min.			
Calcio	Blanco	Estándar	Desconocido
Agua Destilada	50 ul	-	-
Estándar	-	50 ul	-
Muestra	-	-	50 ul
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml
Incubar 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). El color de reacción final es estable por 20 min.			
Magnesio	Blanco	Estándar	Desconocido
Muestra	-	-	10 ul
Estándar	-	10 ul	-
Agua Destilada	10 ul	-	-
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml
Incubar 5 min a temperatura ambiente (15-25°C). El color de reacción final es estable por 60 min.			

RESULTADOS

La valoración en este proyecto fue mediante la comparación de 2 diferentes equipos de lecturas los cuales fueron: espectrofotómetro UV-Visible y el analizador bioquímico EMP-168.

Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos de los análisis bioquímicos- clínicos y los valores de referencia (Tabla 2). Se realizaron 3 determinaciones de las cuales se utilizaron 17 muestras de animales.

Tabla 2. Valores de referencia.

Analito	Colesterol	Magnesio	Calcio
Valor de Referencia	135-260 mg/dl	1.44-2.8 mg/dl	7.5-11mg/dl

Como resultado se obtuvo que las mediciones obtenidas con Wiener lab fueron repetibles y de mayor exactitud cuando se realizaron con el analizador bioquímico EMP-168 en comparación con las obtenidas con el espectrofotómetro. Con base en los resultados los animales se clasificaron en animales sanos y animales con deficiencia y/o enfermedades (Tabla 3).

El hígado y los riñones efectúan un papel importante como órganos de excreción de desechos del cuerpo (Pedrozo, 2015).

El colesterol es un lípido que simboliza una reserva de energía importante para los caninos (Osorio et. al, 2012). Fue el analito más estable al tener todos los datos de lectura dentro del marco de

referencia, que a su vez nos refleja que los caninos no presentan alteraciones del sistema cardiovascular u obesidad inducidas por el un alto nivel de colesterol (Carrillo et. al, 2011).

En cuanto a la alimentación de los animales según (Carrillo et. al, 2011) el colesterol proviene de la dieta, lo cual en base a lo obtenido se concluye que la alimentación proporcionada a los caninos es aceptable y suficiente.

El calcio es uno de los elementos más importantes en los organismos al desarrollar distintos papeles de vitales como es la función neuromuscular, la coagulación de la sangre, la mineralización del hueso y acciones hormonales (Albalate et. al, 2019). La inexactitud de este analito en los datos hace referencia a que el animal tiene un desajuste en cualquiera de estos procesos y/o que el manejo de este analito no fue el correcto técnicamente.

El magnesio por su parte es esencial para la función de algunas enzimas que sus funciones están relacionada a la transferencia de grupos fosfato, a las reacciones que requiere ATP, a la replicación y transcripción de ADN y traducción de ARNm (Rondón, 2006).

Tabla 3. Determinaciones bioquímica-clínicas obtenidas de 3 analitos y 17 muestras (plasma) analizadas. Utilizando las indicaciones del fabricante se logró que Wiener lab mantuviera una buena repetitividad para ambos equipos (espectrofotómetro UV-Vis y analizador bioquímico EMP-168), sin embargo, el analizador bioquímico EMP-168, consiguió ser el equipo más estable para cualquier de los 3 tipo de analitos utilizados en este proyecto.

No. De muestra	Colesterol-UV	Colesterol-EMP	Magnesio-UV	Magnesio-EMP	Calcio-UV	Calcio-EMP
1	148.78	193.64	2.98	1.97	13.45	5.42
2	155.1	188.67	1.96	2.02	11.9	6.49
3	157.14	171.20	0.56	2.17	15.01	10.61
4	159.18	175.96	0.68	1.92	12.87	10.38
5	163.26	182.91	1.9	2.19	12.98	9.5
6	144.89	188.08	2.14	1.95	13.67	11.49
7	162.89	217.67	2.09	1.90	13.11	9.3
8	176.13	140.81	2.39	2.3	6.19	5.68
9	187.63	194.24	2.3	1.98	8.25	6.75
10	187.63	188.67	2.24	2.04	5.5	10.48
11	189.39	171.79	3.85	2.18	6.34	9.5
12	175.97	183.91	4.46	1.93	2.96	11.72
13	183.39	217.08	2.003	2.20	2.02	11.59
14	142.76	141.41	2.56	1.96	3.23	9.7
15	139.52	194.43	1.88	1.92	1.83	10.84
16	153.92	177.35	1.68	2.32	3.5	9.77
17	179.52	141.01	1.82	1.94	7.09	11.59

CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizó un análisis cuantitativo de 3 analitos (Calcio, Magnesio y Colesterol) con el fin de conseguir datos confiables sobre el estado de salud en caninos.

Se visualiza este estudio en fase pre eliminar debido a que aún está en proceso los ensayos de examinación para obtener más datos y poder realizar un análisis de robustez analítica, para confirmar y establecer valores de referencia propios del kit Wiener lab con ambos equipos de lectura como lo son el espectrofotómetro UV-Vis y EMP-168, teniendo una repetibilidad y exactitud correcta en los 3 analitos aquí presentados y en cualquier tipo de análisis bioquímico- clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. M, Albalate. P, Ortiz. E, García. M, Rodríguez, "Trastornos del calcio fósforo y magnesio". Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Infanta Leonor. Madrid, España. 2019
2. B. Bush, "Manual de laboratorio Veterinario de análisis clínico y técnicas de laboratorio", Editorial Acribia. España. 1982
3. A, Carrillo. G, Moreno. J, Tobón, "Manejo farmacológico de la hiperlipidemia en caninos". Rev. Med. Vet. No. 21. Pp 73-85. 2011
4. V. C. d. I., Fuente, "Manual de Patología Clínica" Tamaulipas, México: Universidad Autónoma de Tamaulipas, 2013.
5. E. Kolb, "Fisiología Veterinaria". 2da Edición ed. España: Acribia, 1987.
6. C. A. G. Lamping, "Manual de Diagnostico con énfasis en el Laboratorio clínico Veterinario", 1ra Edición ed. Managua, Nicaragua: Carrera de Medicina Veterinaria- Facultad de Ciencia Animal- Universidad Nacional Agraria, 2014.
7. J. Osorio. Y, Suarez. J, Pérez, "Estudio del perfil lipídico canino por edad y sexo", Rec. Med.Vet. No. 23. Pp 65-72. 2012.
8. J.R. Rodriguez, "Aproximación al análisis de Bioquímica Sanguínea y Uroanálisis en Animales Silvestres y Especies no Convencionales. s.l., s.n, 2013.
9. R, Pedrozo, B. Domel, "Variaciones n las concentraciones séricas del calcio, fósforo y potasio en perros con enfermedades renal crónica en diferentes estados: un estudio preliminar en Paraguay. Cienc. Vet. Pp 20-25. 2015.
10. C. Sodikoff, "Pruebas Diagnósticas y de Laboratorio en pequeños animales", Mosbyc Inc., 2001, 3ra edición.
11. H. Rondón, "Hipomagnesemia". An. Fac. Med. Lima. Pp 38-48. 2006.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *KALANCHOE DAIGREMONTIANA* PLANTA EXTOTICA INVASORA

Guadalupe Lizbeth C. Torres, María Elena García Garza, Sergio Moreno Limón y Jorge Villarreal

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Botánica. 66455. San Nicolás De Los Garza, N.L. México.
sergio.morenoim@uanl.edu.mx biogpecardiel@gmail.com

RESUMEN

Las especies exóticas invasoras tienen un impacto ecológico muy importante en aquellas regiones en las que no son nativas, en este caso México. Al ser introducidas en un nuevo medio, ciertos organismos desarrollan un comportamiento diferente al que tenían en su ecosistema de origen, ya que carecen de las medidas de control de su área de distribución natural. Esas medidas incluyen condiciones específicas del ambiente o competencia por los recursos, que son las que mantienen a las poblaciones dentro de ciertos niveles de equilibrio en los ecosistemas donde han evolucionado de manera natural por largos periodos de tiempo. Los comportamientos nuevos pueden incluir cambios en los patrones de reproducción, crecimiento descontrolado de las poblaciones, desplazamiento de especies nativas o conductas agresivas no mostradas en su medio natural. Un claro ejemplo es la especie exótica invasora *Kalanchoe daigremontiana* una planta perteneciente a la familia Crassulaceae, la cual tiene su origen en Madagascar, esta planta se encuentra causando un serio problema en nuestras Áreas Naturales Protegidas, es por eso que se requiere de métodos estratégicos para su erradicación; por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar la inhibición de crecimiento del *Kalanchoe* en base a cuatro tratamientos utilizando una planta parásita de importancia ecológica conocida como *Cuscuta indecora*, en primera instancia fueron recolectadas muestras de estas dos plantas desde las hojas hasta las raíces, la planta parásita fue colectada junto con la especie exótica Invasora en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey (PNCM) en un Área Natural Protegida (ANP), posteriormente luego de la colecta se realizaron los tratamientos utilizando extractos hidroalcohólicos de la especie parásita en diferentes concentraciones 100mg/ml y 200mg/ml, además de un herbicida comercial y un control (agua destilada). Se demostró que el *Kalanchoe* muestra un bajo rendimiento en su crecimiento al ser roseados durante semanas con los extractos hidroalcohólicos e incluso teniendo mejor resultados que el mismo herbicida comercial, todo esto con respecto al control. Estos resultados muestran un posible control biológico para el *Kalanchoe daigremontiana* especie exótica invasora utilizando una planta parásita causante de daños a cultivos a nivel mundial.

Palabras: ANP, exótica, invasora, parásita.

INTRODUCCIÓN

El *Kalanchoe* es una planta suculenta de la familia Crassulaceae, presenta una gran distribución en climas áridos y cálidos dentro de zonas montañosas, esta planta es nativa de Madagascar, el género como tal incluye unas 125 especies aproximadamente. En particular, el *Kalanchoe* es conocida como “aranto” o “madre de mil hijos”, en México es muy reconocida por su atractivo ornamental, además de atribuirle propiedades medicinales utilizando sus hojas como tratamientos alternativos para distintas dolencias como un relajante muscular, sedante, té para fiebre, hipertensión, entre otros.

Algunas de estas especies como *Kalanchoe daigremontiana* es altamente invasivo e invade zonas semi-áridas en el norte de nuestro país, las especies exóticas invasoras son algunas especies de plantas y animales que sobreviven, se establecen y reproducen fuera de su área de distribución natural. Alteran los entornos en que se encuentran, causando graves daños a los ecosistemas y su biodiversidad, gracias a estas plantas exóticas invasivas se generan cambios de gran importancia en los suelos de la región que estas invaden, además de una sustitución de plantas nativas.

El *Kalanchoe* al desarrollarse y crecer cerca o a lado de otras plantas, ésta les roba los nutrientes-líquidos a través del suelo-raíces; y por lo tanto mata a las plantas y se disminuye la población las plantas nativas de la región. Esta planta en particular no necesita altas cantidades de humedad para poder crecer, desarrollarse y reproducirse. Desplaza a las plantas nativas y endémicas de la región y reduce su área de crecimiento. Aunque se han logrado identificar los impactos ocasionados por

plantas invasoras, no hay consenso sobre los mecanismos que los dirigen, ni sobre la magnitud y dirección de tales impactos (Parker et al., 1999; Vilá et al., 2011).

El *K. daigremontiana* se propaga por medio de sus semillas y brotes de retoños que se encuentran en la base de la planta, además de la formación de plántulas hijas a lo largo de los bordes de sus hojas desprendidas. La especie se puede controlar manualmente siempre que toda la planta, especialmente las hojas y raíces, se eliminen por completo, lo cual hasta el momento ha sido poco eficaz, debido al alto potencial con el que esta se reproduce.

Por ello el presente trabajo muestra una investigación acerca del efecto que tiene diferentes tratamientos utilizando extracto hidroalcohólico de *Cuscuta* una planta parásita, además de un herbicida comercial y teniendo un control para ver su efectividad en la inhibición del crecimiento del *Kalanchoe daigremontiana* para crear un posible método en la erradicación de esta especie altamente invasiva en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de laboratorio

Agua destilada, Alcohol metílico, Cajas petri, Cámara germinadora, Herbicida comercial, Macetas de plástico, Papel aluminio, Papel Whatman número 4, Pinzas, Pissetas, Vernier de medición

Material biológico

Dentro del cañón del "Parque la Huasteca" en el municipio de Santa Catarina, Nuevo León se realizó la colecta cerca del mes de diciembre del 2019 en un polígono de 2802.07m² se tomaron muestras foliares de la planta exótica *Kalanchoe daigremontiana*, así como de la planta parásita *Cuscuta indecora* en el mismo sitio, tomando las hojas, tallos e inflorescencias de cada planta, así mismo un parte de este material fue conservado a temperatura ambiente para la realización de los extractos y muestra



Figura 1. Imagen con las coordenades de sitio de colecta.

Obtención de extractos de *Cuscuta indecora*.

Los extractos botánicos fueron obtenidos a partir de tallos, flores, frutos y semillas de *Cuscuta indecora* secas, las cuales fueron molidas a tamaño de partícula de 0.5-1 mm. Después el polvo obtenido se utilizó para la preparación de los extractos utilizando metanol e hidroalcohólico (agua:metanol 70:30). A 150 gramos. Al material molido se le agregaron 500 ml de cada solución y se dejó reposar por cinco días a temperatura ambiente (27°C), los frascos fueron cubiertos con papel aluminio para evitar la incidencia de luz. Posteriormente se filtró con papel Whatman número 4, luego, el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente hasta la completa evaporación.

Finalmente se recuperó en forma sólida para prepararse en concentraciones de: 100 y 200 mg/ml para cada solvente (Moreno Limón et al., 2011)



Figura 2. *Cuscuta indecora* parasitando *Kalanchoe daigremontiana* observándose un daño en sus hojas (A), *Cuscuta* parasitando plantulas de *Kalanchoe* (B), planta completa de *Kalanchoe daigremontiana* siendo parasitado por *Cuscuta* (C).

Determinación de la actividad inhibitoria de crecimiento del *Kalanchoe daigremontiana*.

Fueron retirados los hijuelos de las plantas adultas del *Kalanchoe daigremontiana*, de los cuales fueron contabilizadas el número de hojas y medidos longitudinalmente. Estas fueron colocadas en un vaso de precipitado para ser desinfectados con 50 mililitros de agua y cloro al 1%, se dejaron reposar por 5 minutos, una vez desinfectados en 25 cajas petri sobre papel Whatman número 4 fueron inoculadas 5 plántulas de *Kalanchoe* con 10 mililitros de agua, las cuales se colocaron en cámaras de germinación por 24 hrs a temperatura ambiente.

Pasadas las 24hrs se trasplantaron las plántulas de cada caja petri a 25 macetas con un sustrato previamente esterilizado, cada una identificada con los cuatro tratamientos (control con agua destilada maceta blanca, herbicida comercial maceta naranja, extracto hidroalcohólico 100mg/ml maceta azul y extracto hidroalcohólico 200mg/ml maceta verde), fueron llevados nuevamente a una cámara de germinación por 3 semanas manteniendo un riego de 30 mililitros de agua destilada por maceta cada 4 días. Posteriormente esperando las 3 semanas a que las plantas obtuvieron un mayor desarrollo, se comenzaron a regar 30 mililitros de cada uno de los tratamientos cada 4 días, por otras 3 semanas. Los datos del crecimiento y numero de hojas fueron registrados en tablas de excel para un análisis varianza estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El género *Kalanchoe* aparte de ser conocido por su valor ornamental, a tomado un giro muy grande en el ámbito medicinal, ya que cuenta con metabolitos secundarios que muestran un interesante espectro de actividad (Garces et al., 2007). Esto se debe a los últimos descubrimientos médicos en los que se le atribuyen componentes en el tratamiento contra el cáncer.

A pesar de la importancia del género, el *Kalanchoe* a nivel mundial se encuentra en la lista de especies invasoras exóticas con potencial invasor, las cuales están causando la extinción de diferentes especies a un ritmo sin precedentes debido a su gran adaptación. Existen pocos estudios

fitoquímicos, de actividad biológica e impacto ambiental que ayudan a la detención y regulación de estas especies altamente invasivas, por lo que el presente trabajo muestra los resultados obtenidos a partir de la aplicación de cuatro tratamientos teniendo un control, un herbicida comercial y extractos hidroalcohólicos de 100mg/ml y 200mg/ml extraídos de la planta parásita *Cuscuta indecora*. Al realizar el análisis de varianza para comparar y determinar si existe algún cambio en el crecimiento de la altura al aplicar los tratamientos, se obtuvo como resultado un valor $P= 1.91$ por lo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con un intervalo de confianza de 95%. En el caso del crecimiento de números de hojas, el análisis indicó un valor $P= 0.1$ que de igual forma indica que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con un intervalo de confianza del 95%. La inhibición del crecimiento respecto a la altura y números de hojas del *Kalanchoe daigremontiana* muestran una reducción en la incidencia de crecimiento semana tras semana en la utilización de dos de los extractos, el hidroalcohólico de 100mg/ml y el hidroalcohólico de 200mg/ml de la planta parásita, además se demostró que el herbicida comercial tiene menor rendimiento en la inhibición del crecimiento con respecto a los extractos hidroalcohólicos.

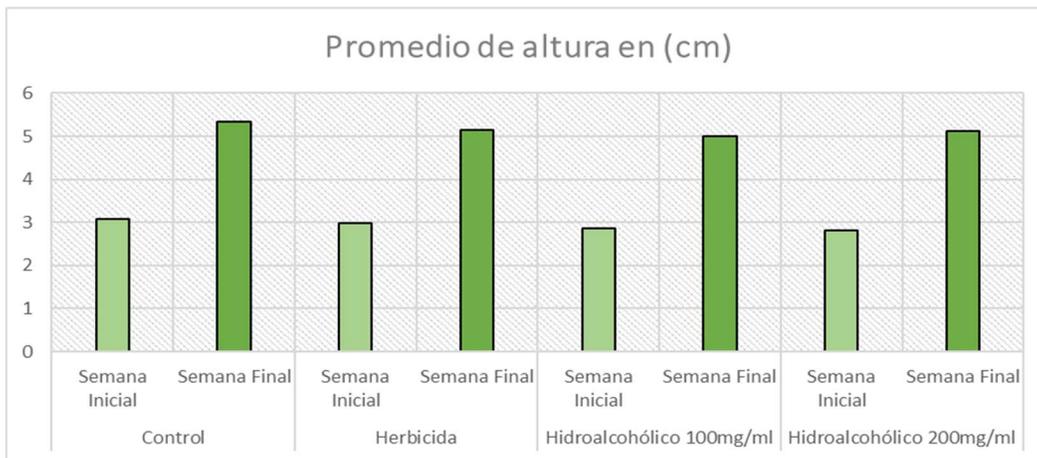


Figura 3. Valores promedios de la altura de las plántulas de *Kalanchoe daigremontiana* registradas en la semana inicial y semana final.

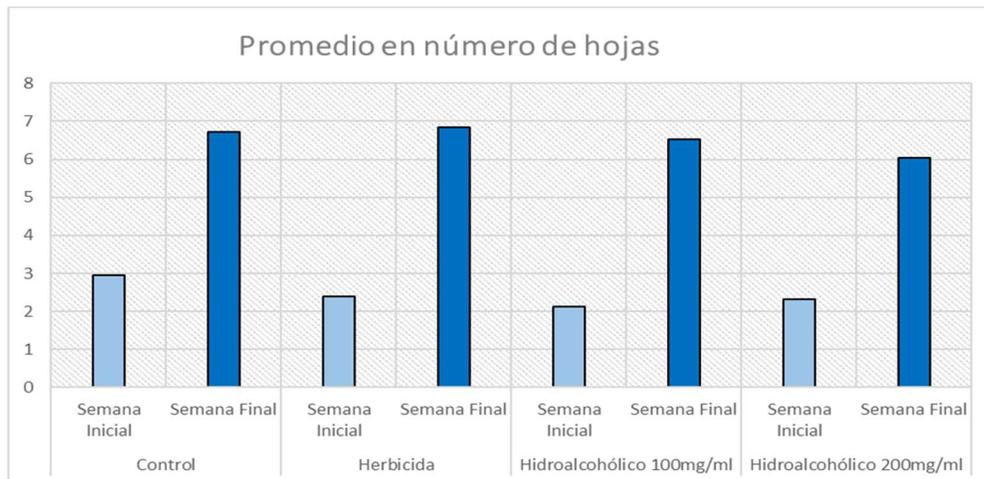


Figura 4. Valores promedios respecto al crecimiento del número de hojas de las plántulas de *Kalanchoe daigremontiana* registradas en la semana inicial y semana final.

CONCLUSIÓN

Luego de evaluar el crecimiento de la planta exótica invasora *Kalanchoe daigremontiana* en respuesta a los distintos tratamientos y a pesar de no presentar una diferencia significativa respecto al grupo control los resultados de esta investigación plantean la posibilidad de crear nuevos métodos que apoyen la erradicación de esta planta invasora en sitios donde es causante del desplazamiento y muerte de especies nativas, también es posible concluir que los resultados de este trabajo contribuyen a entender cómo la especie bajo estudio puede ser aprovechada como fuente de sustancias bioactivas para su aplicación en la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA

1. Garces, H., Champagne, C., Townsley, B. T., Park, S., Malho, R., Pedroso, M.C., Harada, J. and Shinha, N.R. (2007) "Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*" PNAS, 104 (39), 15578-15583
2. Gordon, D.R., Onderdonk, D.A., Fox, A.M., Stocker, R.K. & Gantz, C. 2008. *Kalanchoe pinnata*. En: Predicting Invasive Plants in Florida using the Australian Weed Risk Assessment. Invasive Plant Science and Management 1: 178-195.
3. Herrera I, Hernandez M-J, Lampo M. Plantlet recruitment is the key demographic transition in invasion by *Kalanchoe daigremontiana*. Population Ecology. 2012;54(1):225-37.
4. Moreno-Limón, S., L.N. González-Solís, S.M. Salcedo-Martínez, M.L. Cárdenas-Ávila y A. Perales-Ramírez. 2011. Efecto Antifúngico de extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. Polibotánica, Núm. 32:193-205. ISSN 1405-2768.
5. Parker IM, Simberloff D, Lonsdale WM, Goodell K, Wonham M, Kareiva PM, Williamson M, Von Holle B, Moyle PB, Byers JE, Goldwasser L (1999) Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. Biol. Invas. 1: 3-19.
6. Vilá M, Espinar JL, Hejda M, Hulme PE, Jarošík V, Maron JL, Pergl J, Schaffner U, Sun Y, Pyšek P (2011) Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. Ecol. Lett. 14: 702-708.

SÍLICE MESOPOROSA COMO NANO-EXCIPIENTE DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y PROLONGADA PARA LA GLIBENCLAMIDA

María de la Luz Centeno Mendoza¹, Mercedes Salazar-Hernández², Juan Manuel Mendoza Miranda¹, Agustín Hilario Rocha Ramírez¹, Carmen Salazar Hernández¹

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato. Instituto Politécnico Nacional. Silao de la Victoria México.

²Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología- División de Ingenierías Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato, Gto México.

*msalazarh@ipn.mx.

RESUMEN

El uso de sílice mesoporosa como bioreservorio de fármacos ha presentado un interés especial en las últimas décadas, en gran parte debido a la biodisponibilidad de esta y a que se presentan mecanismo de desorción de los fármacos sensibles al pH. En este proyecto se propone la síntesis de sílice mesoporosa (SM) a partir de precursores económicos como son el silicato de sodio (SM-silicato); la SM-silicato se obtiene empleando como agente de ordenamiento Pluronic-23 y se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo, isotermas de adsorción-desorción de N₂ y microscopía electrónica de barrido. La adsorción de la Glibenclamida se realizó por impregnación simple determinando una capacidad de adsorción máxima del 20%; la cual se alcanzó en 90 min. Finalmente se determinaron los perfiles de desorción del fármaco simulando condiciones fisiológicas gástricas simuladas con un buffer de pepsina, NaCl y HCl de acuerdo con lo establecido por la FEUM.

INTRODUCCIÓN

Los materiales meso-porosos de sílice consisten en un grupo de sólidos inorgánicos compuestos por un sistema de huecos, los cuales pueden encontrarse ordenados formando una geometría bien definida como son hexágonos (MCM-41, SBA-15) o bien desordenados. Sin embargo, en ambos casos, el sólido presenta diámetros de poro entre los 2 y 50nm (clasificación de IUPAC para mesoporo) [1]. Estos materiales tienen diversas aplicaciones como adsorbentes; ya que, dentro de la red de poros pueden alojarse una gran variedad de moléculas. Entonces, han sido empleados como: adsorbentes de contaminantes [2], soporte para catalizadores [3], y en la medicina como sistemas de liberación de fármacos o biomoléculas [4-6], de los cuales pueden destacarse los materiales mesoporosos ordenados compuestos por sílice (SM) ya que estos presentan ventajas como biocompatibilidad, poca o nula toxicidad, así como excelentes propiedades texturales (área superficial, volumen de poro, control en el tamaño de poro) [8].

Recientemente se han empleado los materiales mesoporosos ordenados de sílice como sistemas de liberación continua de fármacos, o bien como matriz de carga de fármacos, ya que estos materiales presentan un alto volumen de poro, cercano a 1 cm³/g y una homogeneidad en la geometría y tamaño de poro; donde puede ser adsorbida la molécula orgánica para posteriormente ser liberada bajo condiciones controladas de pH, temperatura y/o fuerza iónica (véase Figura 1) [9]. Varios autores han reportado la adsorción de una gran variedad de moléculas orgánicas con actividad terapéutica. Por ejemplo, las estructuras de sílice ordenadas como la MCM-41 y la SBA-15 se han empleado exitosamente para adsorber y liberar continuamente fármacos tales como Ibuprofeno, Naproxeno, Carbamazepina, Itraconazol y Fenofibrato, entre otros [10].

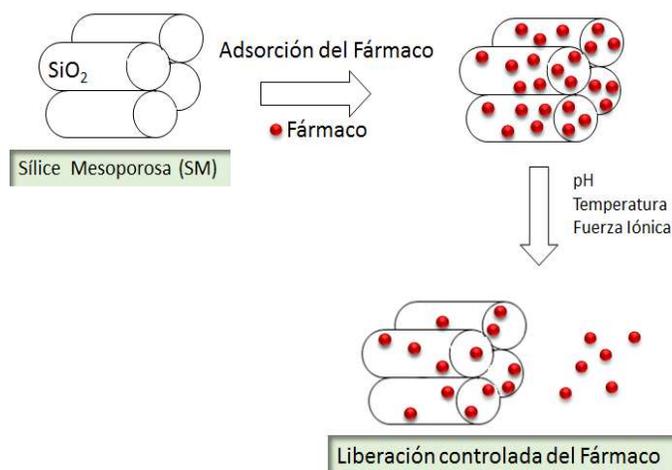


Figura 1. SM como excipiente de fármacos

En este proyecto se propone investigar el uso de una sílice mesoporosa sintetizada a partir de precursores económicos como lo es el silicato de sodio (SM-silicato); empleando como fármaco la Glibenclamida un medicamento perteneciente a la familia de las sulfoniureas, los cuales se caracterizan por ser los antidiabéticos más prescritos para el de la diabetes mellitus II.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de SM-silicato: La SM-silicato es preparada a partir de ácido silícico ($\text{Si}(\text{OH})_4$). El ácido silícico se preparó haciendo una disolución de silicato de sodio (grado industrial) en agua destilada con proporciones 4:1 en volumen, una vez homogenizada la disolución se filtró al vacío para la eliminar sólidos suspendidos. Posteriormente la disolución fue pasada por una columna de intercambio iónico para obtener el $\text{Si}(\text{OH})_4$. La disolución de $\text{Si}(\text{OH})_4$ se obtiene con un pH de 3 y se dejó reposar por 24h para su envejecimiento y adicionarlo a una disolución previamente preparada de Pluronic (P-123, Aldrich 99.9%) al 11% en peso. La gelificación del ácido silícico se realizó a pH de 3 y 40°C por 24 h. El sólido obtenido se filtró a vacío y se dejó secar en la estufa a una temperatura de 60°C por 24h. Para eliminar el surfactante de la estructura de la sílice, se realizó una extracción con etanol (grado reactivo, Karal) en medio ácido (HCl) a reflujo por 24h. Finalmente, el sólido se filtró al vacío para secarse a 60°C por 24 hr y calcinar a 400°C por 4 hr.

Adsorción de Glibenclamida: El fármaco se adsorbió en la SM-silicato por impregnación simple empleando una solución saturada de Glibenclamida en isopropanol y dejando en contacto la SM-silicato por periodos de 30min hasta 180 min. La cantidad de fármaco adsorbido en la sílice se identificó por espectroscopía de infrarrojo empleando un equipo ATR-Nicolet-s Thermocientific y se cuantificó por gravimetría.

Perfiles de desorción de Glibenclamida: La desorción del fármaco se llevó a cabo simulando condiciones gástricas de acuerdo con lo establecido por la FEUM para una SR de fluido gástrico simulado [11]. Esta solución se preparó disolviendo 2.0 g de cloruro de sodio (99%, grado reactivo) y 3.2 g de pepsina (grado reactivo) en 7.0 mL de ácido clorhídrico aforando a 1 000 mL de agua destilada; la solución final tiene un pH de 1.2. Las cinéticas de desorción de GB se realizaron a temperatura constante de 37°C con 10 mL de SR-Gástrica colocando 0.1 gr de SM-silicato/GB; las alícuotas fueron de 2 mL y la concentración de fármaco desorbido se cuantificado por espectroscopia UV-visible a través de la metodología de adición de estándar. La solución de GB estándar empleada se preparó disolviendo 25.5 mg del fármaco con 100 mL de THF (grado reactivo).

Caracterización. Espectroscopía de infrarrojo: Los espectros de IR se obtuvieron en un equipo ATR-FT Nicolet-iS10 Thermo Fisher Scientific; registrándose el promedio de 16 scans y una resolución de 4 cm^{-1} con ventana espectral de 4000 a 600 cm^{-1} .

Caracterización. Isotermas de Adsorción-Desorción de N_2 : Las isotermas de adsorción-desorción de N_2 se obtuvieron a 77 K en un equipo Micromeritics ASAP-2010. Las muestras fueron desgasificadas a $70\text{ }^\circ\text{C}$ y $7\text{ }\mu\text{mHg}$. El área superficial se determinó por el método de Brunauer, Emmett y Teller (BET) y el diámetro promedio del poro por el método Barrett, Joyner y Halenda (BJH) empleando la isoterma de desorción

Caracterización. Microscopía Electrónica de Barrido: La morfología de la SM-silicato; así como las modificaciones de ésta debido a la adsorción del fármaco se observaron por microscopia electrónica de barrido (MEB) empleando un MEB JOEL-6510 plus. Las muestras se colocan en una cintilla de grafito para ser observadas a diferentes aumentos.

RESULTADOS

Síntesis de SM-silicato

La Figura 2 muestra el espectro de infrarrojo para la SM-silicato, donde se observó la adsorción de agua (banda ancha a 3400 cm^{-1} y 1600 cm^{-1}) además, la banda correspondiente a la sílice (grupos Si-O-Si) fueron identificadas a 1010 cm^{-1} y 570 cm^{-1} . Por su parte los silanoles presentes en la estructura del cerámico (Si-OH) se identificaron como banda de intensidad media a 945 cm^{-1} . Los silanoles libres; así como, el agua fisisorbida podrían favorecer las interacciones por puente de hidrógeno y Van der Waals entre la sílice y la molécula del fármaco.

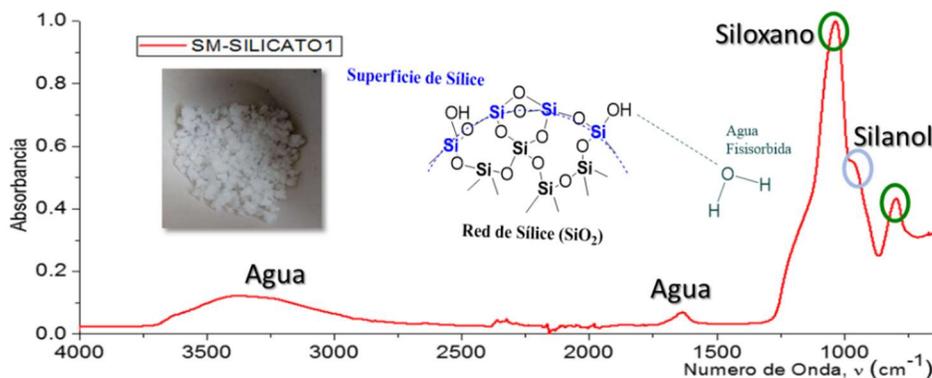


Figura 2. Espectro de infrarrojo Sílice Mesoporosa obtenida a partir de silicato de sodio

En la Figura 3a se muestra la isoterma de adsorción-desorción de N_2 para la SM-silicato; donde se identificó una isoterma tipo IV con lazo de histéresis H2; correspondiente para materiales mesoporosos, la clasificación se basó en los criterios de la IUPAC [12]. El área superficial de BET calculada para este material fue de $543.73\text{ m}^2\text{g}^{-1}$; mientras que el volumen de poro BJH se determinó en $0.4995\text{ cm}^3\text{g}^{-1}$. La distribución de poro (Figura 3b) mostró un arreglo principal con diámetro de 6 nm (d_1) y un pequeño hombro con diámetro de poro de 6.81 nm (d_2). La microscopía electrónica de barrido (Figura 3c) muestra que la MS-silicato es formada por la aglomeración de partículas alargadas tipo bastón que forman porosidad bien definida; la cual es responsable de las propiedades texturales del material (A_{BET} y V_{poroBJH}).

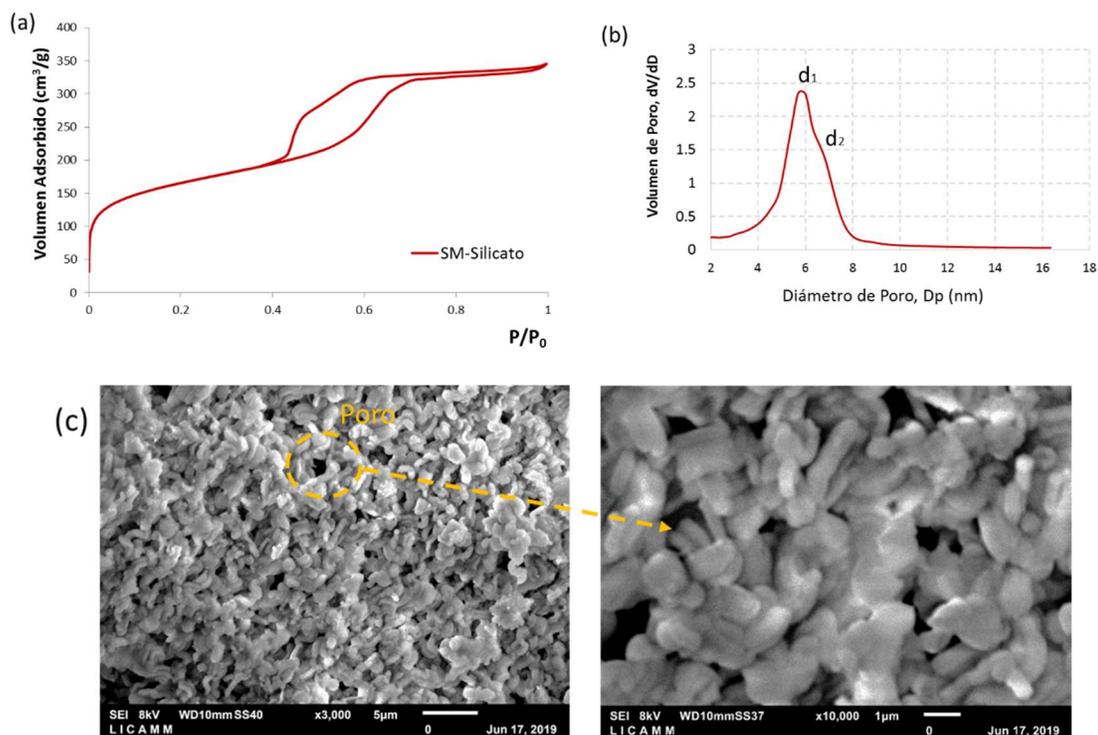


Figura 3. Caracterización de SM-silicato (a) Isotherma de adsorción-desorción de N₂ (b) Distribución de poros (c) Microscopía electrónica de barrido

Capacidad de Adsorción de Glibenclamida en la SM-silicato

La capacidad de adsorción del fármaco en la SM-silicato fue cuantificada a diferentes tiempos como se muestra en la Figura 4a, determinando una capacidad máxima de adsorción de la Glibenclamida en la sílice del 20% en peso y un tiempo de equilibrio a los 90 min. En cuanto a las propiedades texturales, estas se ven disminuidas después de haberse adsorbido el fármaco; la Figura 4b compara las isothermas de adsorción-desorción de N₂ para la SM-silicato con la SM-silicato a los 90 min de adsorción. Después de la adsorción se conserva el tipo de isoterma y el lazo de histéresis (isoterma tipo IV con lazo de histéresis H2) disminuyendo el A_{BET} a 474.49 m²g⁻¹ (-12.73%) y el V_{pBJH} a 0.3985 cm³g⁻¹ (-20.22%). De acuerdo con la distribución de poros mostrada en la Figura 4c; la población de poros se ve reducida considerablemente quedando una distribución unimodal a 5.43 nm.

De acuerdo con la microscopía electrónica de barrido, Figura 4d; la reducción en la cantidad de poro se debe a un cambio en la morfología de la sílice. Los poros presentes en el material son colapsados debido al alojamiento del fármaco en ellos; formando un cierre de la estructura que a aumentos de 10,000X se puede observar la conservación de algunos de éstos poros; los cuales quedan de forma interna y entre partículas cerradas de la SM-silicato/GB.

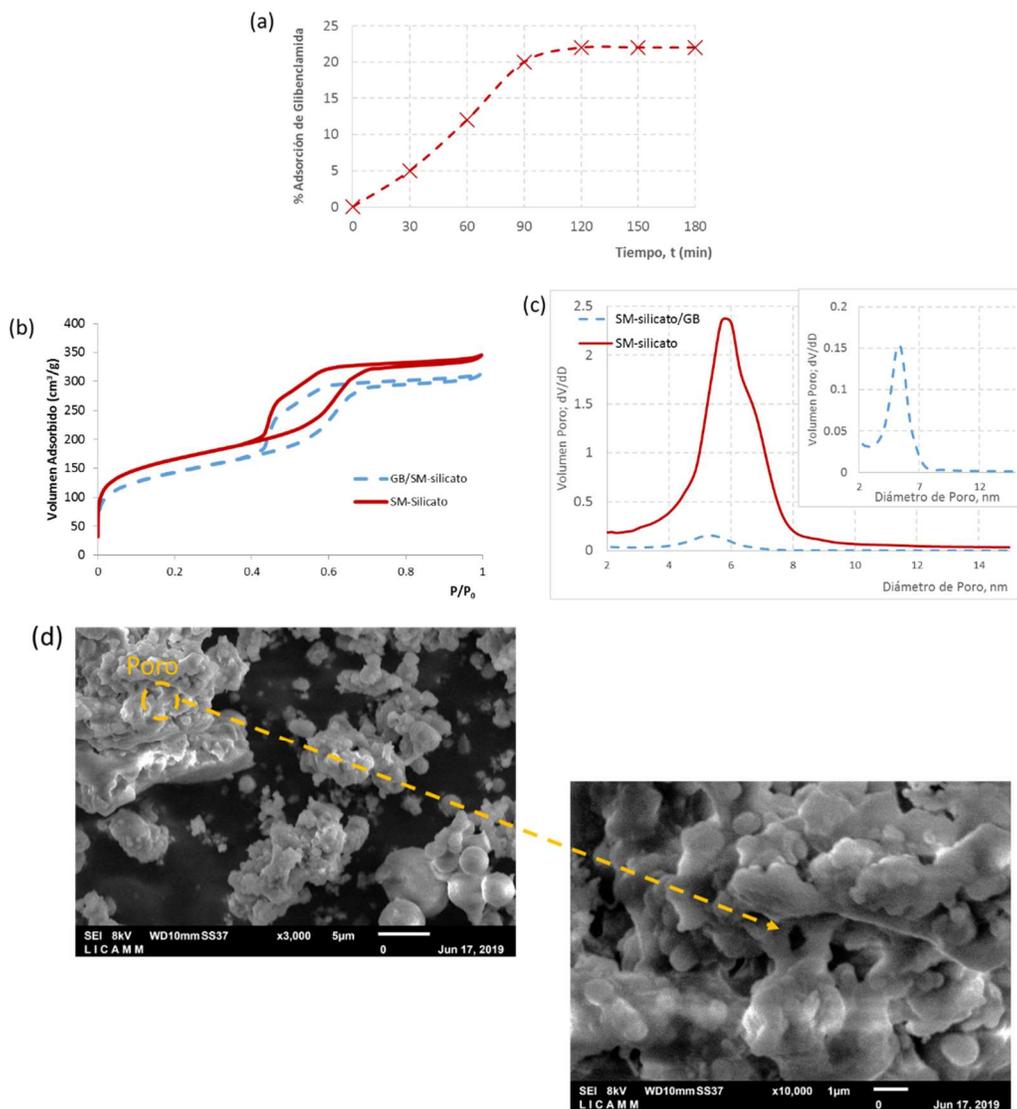


Figura 4. (a) Capacidad de adsorción de GB en SM-silicato (b) Modificación de isothermas de adsorción-desorción de N₂ debido a la adsorción de GB (c) Cambio en la distribución de poros después de la adsorción de la GB (d) MEB para SM-silicato/GB

Perfiles de Desorción de GB adsorbida en SM-silicato

La GB es un polvo cristalino blanco casi insoluble en agua, por lo que la cuantificación del fármaco se realizó adicionando un estándar; como estándar se utilizó 50 mL de una solución de GB en THF con concentración de 0.255 mg/mL. La Figura 5a muestra la curva de calibración empleada para la cuantificación del fármaco y en la Figura 5b se muestran los datos de desorción obtenidos para la liberación de GB simulando condiciones gástricas; la sílice permitió controlar la cantidad de fármaco liberando en los primeros 30 min una cantidad de 1.68 mg y manteniendo constante su liberación a una velocidad de 0.063 mg/min. El porcentaje máximo de fármaco liberado fue del 93.8 % en un tiempo de 510 min.

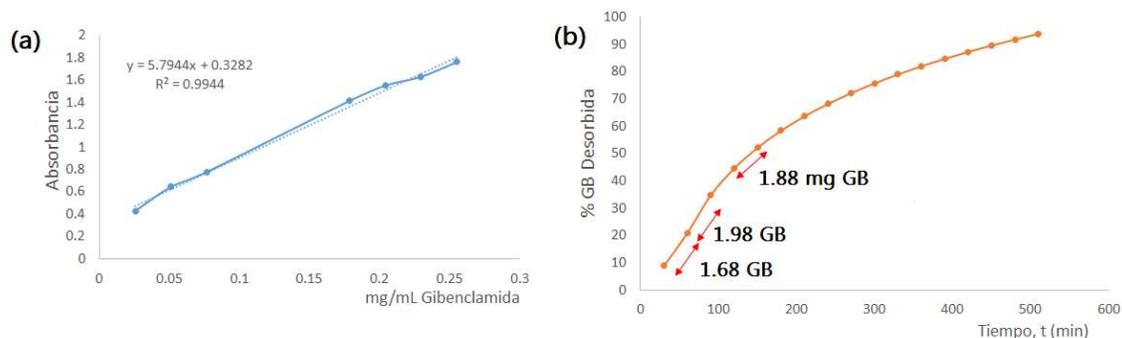


Figura 4. (a) Curva de Calibración (b) Perfil de desorción de GB/SiO₂-silicato a condiciones simuladas de jugo gástrico

CONCLUSIONES

Los sistemas de sílice mesoporosa sintetizada a partir de silicato de sodio dosifican cantidades pequeñas del fármaco (1.88 mg de GB) controlando su dosificación a una velocidad de desorción de 0.063 mg/min requiriendo un tiempo total para la liberación del 90% del fármaco de 8.5 hr. Estas características permiten disminuir la posibilidad de presentar efectos secundarios; como son el daño hepático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Giraldo L.F, López B.L, Pérez L, Urrego S, Sierra L, Mesa M, Mesoporous silica application (2007) *Macromol. Symp.* 258, 129:141
2. Sayari A, Hamoudi S, Yang Y, Applications of pore-expanded mesoporous silica. 1. Removal of heavy metal cations and organic pollutants from wastewater, (2005) *Chem. Mater.* 17, 212-216
3. Chamack M, Mahjoub A.R, Akbari A, Zirconium-modified mesoporous silica as an efficient catalyst for the production of fuel additives from glycerol (2018) *Catalysis Communications*, 110, 1:4
4. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, Che E, Hu Liang, Zhang Q, Jiang T, Wang S, Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical application (2015) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11, 313-327
5. Adhikari Ch, Mishra A, Nayak D, Chakraborty A, Drug delivery system composed of mesoporous silica and hollow mesoporous silica nanospheres for chemotherapeutic drug delivery (2018) *Journal of drug Delivery and Technology*, 45, 303-314
6. Zhou Y, Quan G, wu Q, Zhang X, Niu B, Wu B, Huang Y, Pan X, Wu Ch, Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2) 165:177
7. Rahmani S, Durand J-O, Charnay C, Lichon L, Férid M, Garcia M, Gary-bobo M, Shynthesis of mesoporous silica nanoparticle and nanorods: Application to doxorubicin delivery (2017) *Solid State Sciences*, 68, 25-31
8. Rahman I.A, Padavettan V, Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification and application in silica-polymer nanocomposites- A review (2012) *Journal Nanomaterials*. ID 132424, 15 pages
9. Mitran R-A, Matei C, Berger D, Bajenaru L, Moisescu M.G, controlling drug release from mesoporous silica through an amorphous nanosconfined 1-tetradecanol layer (2018) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 318-325
10. Slowing I.I, Trewyn B.G, Giri S, Lin V. S.Y, Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing application (2007) *Adance Functional Materials* 17, 1225-1236
11. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Volumen 1* (2011) décima edición. México

12. Neimark A.V, Ravikovitch P.I, Grûn M, Schûth F, Unger K.K, Pore Size Analysis of MCM-41 Type Adsorbents by Means of Nitrogen and Argon Adsorption (1998) Journalof colloid and Interface Science, 207 (1) 159-169.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) por su apoyo financiero a través del proyecto SIP-Innovación 20196850 y 20200941. Además, se agradece al LICAMM-Universidad de Guanajuato por el soporte técnico en la MEB.

CARACTERIZACION DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DE LA PARED DE ESPORAS DE *AGARICUS BISPORUS* VAR *PORTOBELLO*, MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.

Diana Itzel Rojas Flores¹, Violeta Sánchez Martínez² y Virginia A. Robinson Fuentes³

¹Facultad de Químico Farmacobiología, ²Programa Institucional en Biotecnología, ³Laboratorio de Desarrollo Analítico, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina. UMSNH
itzeerf47@gmail.com valloleta97@gmail.com vrobinsonf@gmail.com

RESUMEN

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de electromigración utilizada para el análisis y determinación de sustancias de interés bioquímico; sin embargo, se ha demostrado su utilidad en el análisis de bacterias y levaduras, ya que representa una herramienta más en la identificación de especies en los laboratorios de diagnóstico. Uno de los mayores problemas que representan las muestras de gran complejidad como las poblaciones de microorganismos, es la dificultad de obtener resultados reproducibles pues los microorganismos tienden a agregarse entre sí y a las paredes de capilar en las que se analizan. Se han utilizado varias estrategias para evitar este problema siendo la de mayor resultado, la modificación de los grupos funcionales de la pared. Así que el estudio de dichos grupos ayudará a lograr muestras de poblaciones homogéneas que puedan analizarse más fácilmente. Pocos son los estudios que se han realizado por EC en esporas de hongos, por lo que, en este estudio se determinarán los pKa's de los grupos funcionales de la pared de esporas de *Agaricus bisporus* var Portobello. Se obtuvieron los basidiocarpos de *A. bisporus* var Portobello de manera comercial; las esporas se obtuvieron mediante suspensión con agua destilada; se lavaron tres veces para después realizar suspensiones de 25, 20 y 15 mg de esporas en 5 mL de solución salina 10 mM. Cada suspensión se valoró por potenciometría con NaOH y HCl 0.1 M adicionando 1, 5 y 10 μ L en el intervalo de pH de 3 a 11. Con los resultados, se construyeron curvas de valoración para obtener los valores de pKa. Por otro lado, se realizó el análisis de las suspensiones por EC, que se prepararon de la misma manera. Sólo que en este caso se usaron alícuotas de 200 μ L que se colocaron en 2 tubos de 0.5 mL a los que se les adicionaron distintos volúmenes de NaOH y HCl 0.1 M, en el mismo intervalo de pH. El análisis se hizo en un equipo Beckman Coulter, usando un capilar de 40 cm de Lt y aplicando un voltaje de 2 KV por un minuto. Se encontraron cambios de pH en el intervalo de 4.5-9, que representan a los pKa's de los grupos funcionales de pared de las esporas. Los resultados obtenidos por EC corresponden a los valores obtenidos por potenciometría.

INTRODUCCIÓN

La Electroforesis Capilar (EC) es una técnica instrumental que separa diferentes componentes debido al movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones) o sustancias neutras, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. El campo eléctrico es el que provoca el movimiento de los componentes por un capilar; se puede utilizar con moléculas con o sin carga [1]. Una ventaja distintiva de esta técnica son los pequeños volúmenes de solventes y tampones (buffers) requeridos, generando así pequeños volúmenes de residuos. Parte de la versatilidad y la eficacia que tiene esta técnica se debe a que combina elementos de distintas técnicas analíticas; por ejemplo, utiliza detectores de alta sensibilidad como en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el uso de capilares de sílice fundida (SiO_2), como en la cromatografía de gases (GC) [2].

La EC ha tenido gran impacto en la medicina, permitiendo la separación de aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, contaminantes alimenticios, material genético y algunos fármacos [3]. Son pocos los estudios que usan EC en el análisis y caracterización de microorganismos aun cuando sus características los hacen ideales para poder ser analizados por esta técnica. Los microorganismos pueden adquirir la carga de su superficie de dos maneras diferentes. La primera es debido a la ionización de los grupos superficiales como resultado de la protonación o desprotonación de moléculas de superficie ácidas o básicas, siendo los grupos ionizables más comunes en la superficie externa del microorganismo los ácidos carboxílicos, fosfatos, aminas y residuos de sulfatos. La carga superficial también se puede adquirir mediante la adsorción de iones de la solución circundante. De acuerdo con el tamaño y la naturaleza química de

la superficie de la partícula coloidal va a depender la cantidad y el tipo del ion absorbido [1]. Se ha utilizado la EC para obtener información sobre las propiedades de algunos géneros fúngicos; esto es importante ya que así se pueden conocer las características de adhesión o repulsión entre las mismas células y distintas superficies [4]. Con esta información se pueden diseñar estrategias que permitan la modificación de algunas propiedades de pared y que puedan servir para la identificación y/o caracterización de diferentes géneros fúngicos.

La pared celular fúngica es una estructura compleja y dinámica muy importante, ya que representa una barrera de permeabilidad y un escudo protector; es rígida y está conformada principalmente por glucanos, glicoproteínas y quitinas (Fig. 1), este último polisacárido se encuentra presente en todas las especies fúngicas, estableciendo la fuerza y la forma física de la pared, en su membrana celular contiene ergosterol [5,6]. Como se mencionó, la pared celular fúngica está compuesta de glicoproteínas y polisacáridos, principalmente glucanos y quitina. Existen otros componentes adicionales que varían de acuerdo a la especie fúngica. Las glicoproteínas de las paredes celulares están altamente ramificadas con uniones N- y O- a carbohidratos y contienen glicosilfosfatidilinositol (GPI) como ancla a la membrana celular. El componente glucano es predominantemente beta-1,3-glucano, cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces beta-1,3. Los glucanos pueden tener uniones alternadas beta-1,6 en algunas células. La quitina es sintetizada como cadenas beta-1,4 unidas a residuos por N-acetilglucosamina y son menos abundantes que las porciones glicoproteína o glucano de la pared. La composición de la pared celular está sujeta a cambios y puede variar dentro de un mismo aislado fúngico, dependiendo de las condiciones y etapa de crecimiento. Las glicoproteínas, los glucanos y la quitina están muy entrelazadas y forman una red compleja que es la base estructural de la pared celular [6,7,8].

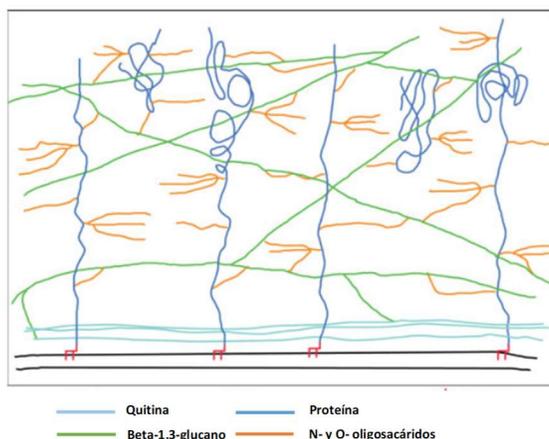


Figura 1. Pared celular de las esporas fúngicas [6].

Una característica importante de la pared celular es que es una estructura en continua evolución en respuesta al ambiente y durante el ciclo celular. La capa externa de la pared varía en relación con el morfotipo, la etapa de crecimiento y la especie fúngica, las modificaciones más importantes observadas son en la capa externa [6,9].

Se ha utilizado la EC para obtener información sobre las propiedades de algunos géneros fúngicos; esto es importante ya que así se pueden conocer las características de adhesión o repulsión entre las mismas células y distintas superficies [4]. Con esta información se pueden diseñar estrategias que permitan la modificación de algunas propiedades de pared y que puedan servir para la identificación y/o caracterización de diferentes géneros fúngicos. Recientemente, Rogowska *et al* [10] utilizaron diferentes técnicas para elucidar los grupos funcionales predominantes en *Saccharomyces cerevisiae*, incluyendo potenciometría; información les permitió usar iones calcio para lograr la agrupación de las células de la levadura estudiada. Por otro lado, Oukacine *et al* [11] utilizaron la EC para realizar microvaloraciones de diferentes sistemas pH, tanto de sistemas

orgánicos como inorgánicos. En este trabajo se hace una combinación de ambas estrategias para conocer los pKa de los grupos funcionales de pared celular de *Agaricus bisporus* var Portobello, como hongo modelo, en condiciones ácidas y básicas; sin embargo, se evalúa la utilidad de la EC en la obtención de los pKa de células fúngicas.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de esporas: Se realizó la cosecha de esporas de los basidiocarpos de *Agaricus bisporus* var. Portobello, hongo modelo para este estudio, con agua destilada y se obtuvo una suspensión. Las esporas se lavaron 3 veces con agua destilada y se centrifugaron para obtener esporas secas a T ambiente.

Preparación de suspensiones: Se realizaron suspensiones de 25, 20 y 15 mg de las esporas en 5 mL de solución salina 10 mM.

Valoración por potenciometría: Las suspensiones de esporas se valoraron con HCl o NaOH 0.1 M adicionando 1, 5 y 10 mL en el intervalo de pH de 6 a 3 y 5 a 11, respectivamente, para construir curvas de valoración.

Análisis mediante electroforesis capilar: Se prepararon suspensiones de 25, 20 y 15 mg de esporas con 5 mL de 10 mM NaCl, de cada suspensión, se tomaron alícuotas de 200 μ L en tubos de 0.5 mL y se adicionaron distintos volúmenes de HCl o NaOH 0.1 M, usando los volúmenes de las valoraciones en el intervalo de pH de 6 a 3 y 5 a 11, respectivamente. El análisis se hizo en un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ, usando un capilar de 40 cm y aplicando un voltaje de 2 KV por un minuto.

RESULTADOS

Con los resultados obtenidos por potenciometría, se construyeron gráficas de pH vs. Vol. de HCl 0.1 M. Se encontraron cambios significativos de pH en el intervalo de 4.5 a 6 y para visualizar mejor esos cambios, se usaron menores volúmenes de valorante. Los cambios se visualizan mejor usando 20 mg de esporas. Los resultados muestran que existen cambios significativos entre los valores de pH de 5.0 y 5.4 (Figura 2A), en este intervalo se encuentran los pKa's de los grupos funcionales de superficie en medio ácido.

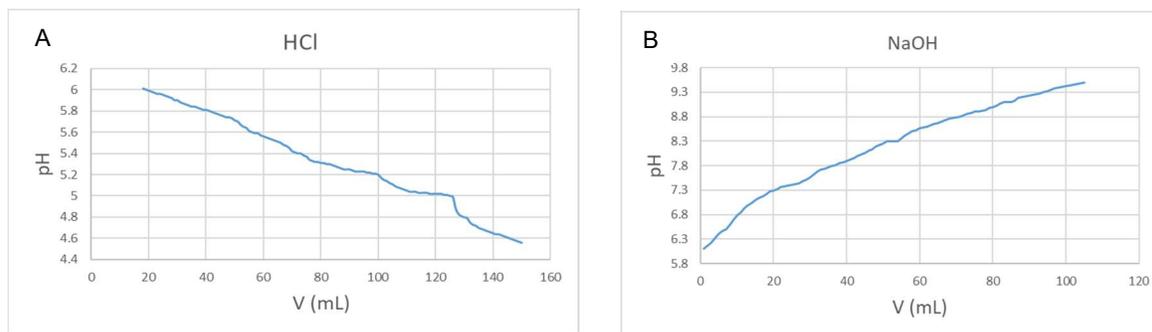


Figura 2. Curvas potenciométricas de pH en función del volumen añadido de HCl 0.1 M (A) y NaOH 0.1 M (B) para una suspensión de 20 mg esporas de *Agaricus bisporus* var Portobello en 5 mL de NaCl mM.

Por otro lado, se observaron cambios de pH que son atribuibles a los puntos de equivalencia de los grupos funcionales de pared en los intervalos 7.3-7.8 y 8-3-8.5 (Figura 2B), después de adicionar NaOH 0.1 M. Al igual que en caso anterior, a mayor cantidad de esporas, se observan mejor los cambios; sin embargo, no todos los hongos producen una gran cantidad de esporas, por lo que aún con 20 mg, son suficientes para observar bien los cambios de pH.

Para los análisis por EC, se midió la intensidad de corriente promedio de cada electroferograma y se le hizo una corrección debido a la dilución, usando la siguiente fórmula:

$$I_{corr} = (I_{(0.1-1.0)} - I_{res}) * \left(\frac{V_o + V_a}{V_o} \right)$$

Donde la I_{corr} es la intensidad corregida; I_{res} es la intensidad residual debida al solvente (agua); V_o , el volumen inicial (200 mL) y V_a es el volumen de HCl o NaOH añadido. Con esta información, se construyeron las gráficas de I_{corr} en función del pH (Figura 3). Las inflexiones observadas corresponden a los cambios de pH observados por potenciometría, algunos cambios son muy sutiles.

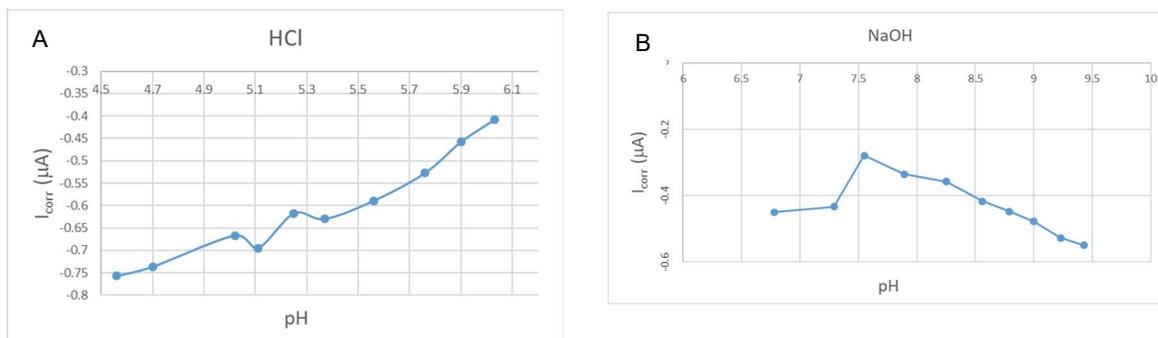


Figura 3. Intensidad de corriente corregida en función del pH, para condiciones ácidas (A) y básicas (B). El resto de las condiciones experimentales se mencionan en el texto.

De la Figura 2A se pueden observar inflexiones en los valores de pH de 5.0 y 5.25, aproximadamente, que corresponden a las inflexiones observadas en la Figura 3A. En cambio, los cambios son menos apreciables en la Figura 2B, aunque existen inflexiones en 7.2, 7.5 y 8.3, que corresponden a valores similares en la Figura 3B. Entonces, los cambios se aprecian mejor en los experimentos realizados por EC ya que se manifiestan como picos. Como se mencionó anteriormente, esos valores de pH son los correspondientes a los pKa de los grupos de superficie de las esporas de *Agaricus bisporus* var. Portobello. Aun cuando los resultados son muy prometedores, ahora falta elucidar, para luego corroborar, la naturaleza de dichos grupos funcionales usando técnicas analíticas complementarias que permitan conocer más a fondo la naturaleza dichos grupos funcionales.

CONCLUSIONES

La electroforesis capilar demostró ser una técnica útil para la determinación de los pKa tanto en pH ácido como básico, de los grupos funcionales presentes en la pared celular de esporas de *Agaricus bisporus* var. Portobello. Los valores obtenidos son semejantes a los obtenidos mediante potenciometría. Esto representa una gran ventaja porque se pueden obtener los mismos valores que en una valoración potenciométrica, usando volúmenes más pequeños y en un tiempo menor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Desai MJ, Armstrong DW. 2003. Separación, identificación y caracterización de microorganismos por electroforesis capilar. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (1), 38-51. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.38-51.2003>.
2. Chopin M. (2012). Principios Básicos de Electroforesis Capilar: Técnica Analítica de Separación de Analitos, *Investigación en Discapacidad*, 1 (2): 86-89.
3. Magaña JJ, Arenas-Sordo ML, Gómez R. (2009). Capillary electrophoresis, a new diagnostic tool. *Revista Médica de Chile*, 137(7):946-956. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000700014>.
4. Salazar, L., Robinson, V. (2018). Estudios de las propiedades de pared de conidias de *Trichoderma* spp por electroforesis capilar. *Desarrollo científico en México*, 165-170.

5. Walker L, Sood P, Lenardon MD, Milne G, Olson J, Jensen G, Gow NAR (2018). Las propiedades viscoelásticas de la pared celular fúngica permiten el tránsito de AmBisome como vesículas liposómicas intactas. *mBio*,9(1), e02383-17. <http://doi.org/10.1128/mBio.02383-17>.
6. Bowman SM, Free SJ (2006). The structure and synthesis of the fungal cell Wall. *BioEssays* 28:799-808.
7. Rivera A. (2017). Cuantificación de beta-glucanos en diferentes especies de hongos: Hongo Robellón (*Lactarius deliciosus*), Hongo Blanco (*Boletus edulis*), Champiñón (*Agaricus bisporus*) y Shiitake (*Lentinus edodes*) y cuantificación de arabinoxilanos en malta y bagazo de cerveza. Tesis de Maestría. Universidad de Girona.
8. Ponton J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. (25):78-82.
9. Latge JP. (2010). Testing the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*. 12(7): 863-873.
10. Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V, Król A, Rafińska K, Buszewski B. (2018). The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* modified by calcium ions. *Scientific reports*, 8(1), 7261.
11. Oukazine F, Choisnard L, Gèze A, Peyrin E. (2019) Capillary electrophoretic apparatus for the end point detection in microtitration methods. *Journal of Chromatography A*,1597:220-224.

GENERACIÓN DE DOS COMPLEJOS DE METFORMINA CON COBRE (II) DE BAJO COSTO A PARTIR DE MEDICAMENTO CADUCO

María del Carmen Hernández Galindo, Rosa Gazmín Huerta Hernández, Yeudiel Itamar Saucedo García, Rodrigo Martínez Martínez, Elia Net Matus Castro.

Universidad de la Cañada
carmengalindo@unca.edu.mx

RESUMEN

Los medicamentos sirven en el tratamiento contra enfermedades, pero son contaminantes potenciales al caducar. En la UNCA se han recolectado medicamentos caducos para evitar la contaminación ^[1], los cuales se usan en docencia como ejemplos de formulaciones y para obtener su principio activo. Han sido reportados metalofármacos a partir de fármacos, razón por la cual hemos sintetizado metalofármacos con fármacos extraídos de medicamentos caducos, basándonos en métodos reportados ^[2-4] y cambiando parte del proceso para obtenerlos a bajo costo, usando alcohol y bicarbonato comercial. Uno de los medicamentos más usados es la metformina, en el tratamiento de la diabetes. Así mismo hay grandes cantidades que son desechadas de forma incorrecta. Nos propusimos la tarea de recuperar el principio activo del medicamento caduco y formar con ello un metalofármaco de cobre(II). La reacción generó dos complejos un monómero y un dímero. Ambos ya han sido reportados de forma individual en procesos con condiciones específicas. Las condiciones de reacción que proponemos nos permite generar cualquiera de los complejos de forma económica, además de que se observó que el equilibrio en la reacción puede ser desplazado a voluntad para formar cualquiera de los dos complejos durante el proceso. La diferencia de color entre el monómero y el dímero, se propone que es debido al cambio del ambiente en torno al átomo de Cu(II): en geometría cuadrada plana el complejo es rosa y en un ambiente octaédrico se presenta en color azul ^[2-4]. Se da una interconversión entre el dímero y el monómero en la reacción, el paso de monómero a dímero se da con aumento de temperatura y tiempo o por adición de exceso de cobre, y del dímero al monómero afecta la adición extra de metformina y bicarbonato. El complejo dimérico no ha sido reportado, y el monómero ha sido reportado por otros métodos complejos. A futuro se probarán estos para diabetes tipo II y cáncer ya que la metformina ha presentado actividad biológica no sólo como hipoglucemiante^[6].

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, buena parte de los estudios científicos han volcado su esfuerzo en el estudio y cura del cáncer. Al momento los tratamientos de dicha enfermedad son caros. Por si esto fuera poco, los efectos secundarios son muy fuertes: mareos, náuseas, vómitos, pérdida del apetito, pérdida de cabello, disminución drástica de peso, entre otros ^[7], razón por la cual muchos pacientes deciden abandonar el tratamiento o en varias ocasiones ni siquiera lo aceptan. Este problema es debido a la presencia del metal en la molécula, el cual al ser detectado como un ente ajeno genera este tipo de problemas. La Dra. Lena Ruíz se ha enfocado a la síntesis de metalofármacos con metales que puedan ser aceptados más fácilmente en el cuerpo, tales como el cobre, generando así complejos que puedan tener selectividad y sean menos agresivos en el tratamiento de la enfermedad ^[8]. Siendo todos estos metalofármacos a diseño.

Otro grupo de metalofármacos que se ha desarrollado es a partir de fármacos comerciales los cuales son colocados a reaccionar con metales diversos ^[2-4,9-10]. Dichos complejos han presentado mejores propiedades en comparación con los fármacos de los cuales proceden ^[2]. Así, varias investigaciones actualmente se enfocan en la generación de metalofármacos de fármacos comerciales, ya que la ventaja que se tiene es que el fármaco comercial ha sido estudiado y se conocen sus efectos secundarios y su aplicación, facilitando por tanto los estudios para conocer la actividad biológica de los nuevos complejos.

Por otro lado, el uso de medicamentos ha ayudado al ser humano por mucho tiempo en el área de la salud, siendo actualmente una fuente de contaminación importante en el planeta. En México se ha tratado de regular este problema ^[11,12], sin embargo, en muchas comunidades no se ha instituido

parte de este trabajo. Tal es el caso de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, en donde al igual que en muchas otras comunidades el desechar los medicamentos caducos es la acción de tirarlos al drenaje o basura. En la Universidad de la Cañada el Maestro Oscar Zúñiga comenzó un estudio correspondiente a los medicamentos caducos ^[1], apoyado con alumnos de la institución y comenzando con ello una campaña permanente de recolección de medicamentos caducos. Al inicio estos medicamentos fueron usados como apoyo didáctico en el área de docencia. Posteriormente nos comenzamos a preguntar el cómo poder usarlos nuevamente. Existen reportes de métodos de extracción de los principios activos de los medicamentos ^[13] y a partir de ello comenzamos a elaborar un plan de extracción que fuese económico. Con ello obtener el fármaco libre y puro para poder usarlo en la formación del metalofármaco. Para la síntesis de complejos existen varios métodos reportados ^[3-4] que necesitan condiciones específicas de reacción (como sistemas de calentamiento y/o reflujo) y reactivos costosos. Se propuso por tanto cambiar reactivos y condiciones de reacción en la formación del complejo. De esta manera, se obtuvieron los complejos reportados por separado usando un mismo método. Lo innovador que se presenta en este trabajo es que con medicamentos caducos se pueden generar metalofármacos de bajo costo, para que puedan ser accesibles económicamente. El poder proponer a las industrias farmacéuticas un método adecuado para cada metalofármaco y así poder generar tratamientos para diversas enfermedades a bajo costo.

TEORÍA

Desde el siglo pasado se han estudiado los complejos de fármacos con metales ^[15], sin embargo, la actividad biológica no había sido estudiada con suficiente interés sino más bien sus aplicaciones industriales ^[14]. A inicios de este siglo dicha atención se ha enfocado en los metalofármacos de ese tipo debido a los correspondientes estudios de actividad biológica. La metformina es un compuesto que se ha usado en tratamientos contra la diabetes mellitus tipo II, es proporcionado por las instituciones de salud con mucha frecuencia para el control de dicha enfermedad. Ha llamado la atención al grado de que varios autores se han dado a la tarea de generar los complejos de metformina con cobre(II) ^[3-4].

Para generar complejos, algunos autores compran el compuesto ^[16], otros sin embargo reportan la extracción a partir del medicamento ^[13]. Investigadores de la UAZ y del ITESI reportaron la extracción de metformina a partir del medicamento con metanol grado HPLC, disolviendo las pastillas trituradas, filtrando y llevando a refrigeración para obtener los cristales; y finalmente filtrarlos al vacío. Método que permite mantener intacta la estructura del compuesto en el proceso de extracción ^[13].

Revisando información respecto a la generación de metalofármacos de cobre y metformina se encontró el reporte de dos estructuras cristalinas del complejo monomérico de cobre ^[4] (Figura 1), que fueron generados a partir de la adición de cloruro de cobre dihidratado al clorhidrato de metformina, dejando la mezcla a evaporación lenta en el aire para obtener los cristales azules (figura 1, complejo II); mismo procedimiento pero con adición de sodio en metanol para la obtención del compuesto naranja (Figura 1, complejo I), el cual es un complejo que presenta dos moléculas de agua en su estructura cristalina.

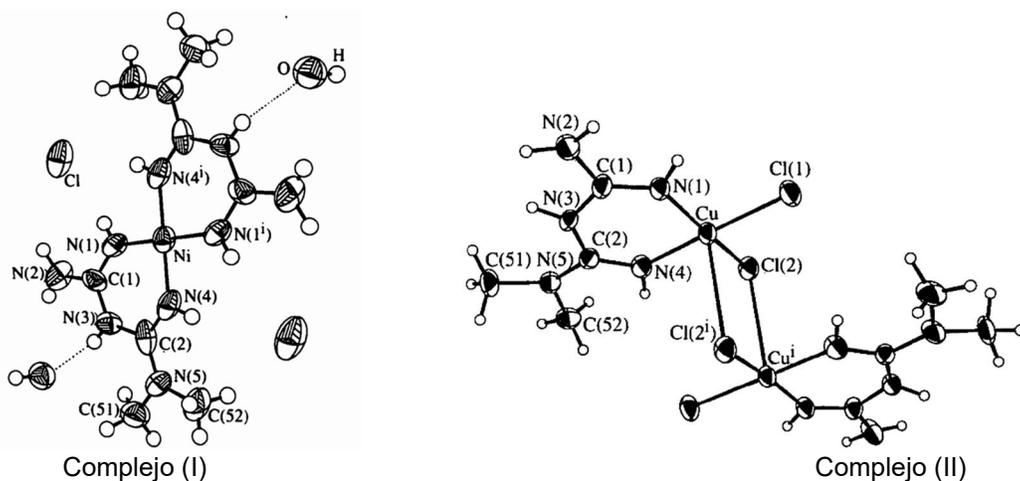


Figura 1

Es de llamar la atención que la generación del monómero (complejo I) ha sido reportado con variaciones de color, que van desde un rosa pálido [3], pasando por fucsia [17] hasta un color rojo [18]. Siendo elucidada la estructura de éste último por difracción de rayos X (figura 2).

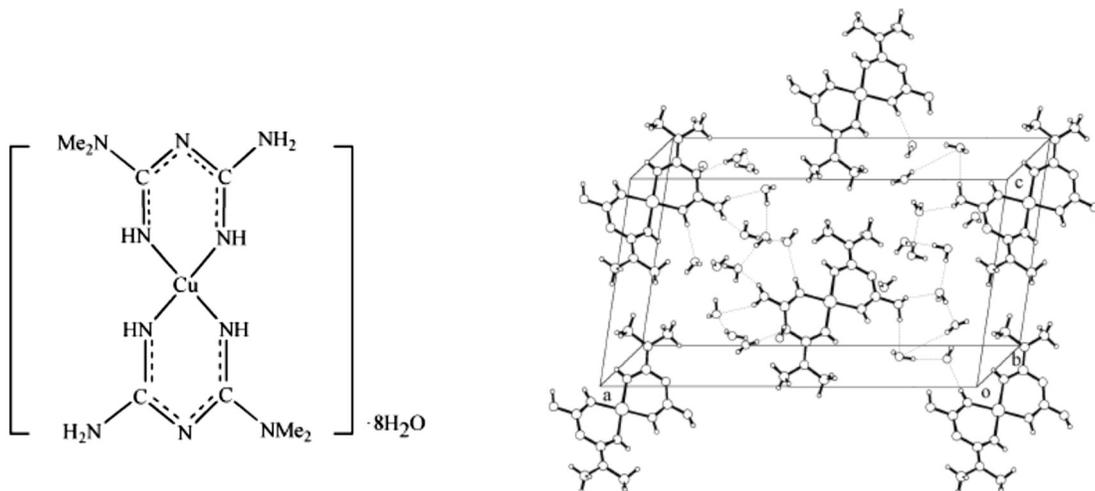


Figura 2

En el caso del precipitado rosa pálido [3], se propone la estructura anhidra del compuesto, la cantidad de moléculas de agua en torno al complejo da como resultado los colores variados del mismo.

PARTE EXPERIMENTAL

Primero se procedió a la recolección y clasificación de los medicamentos caducos, eligiéndose para este trabajo medicamentos con 1 a 2 años máximo de caducidad, para extraer la mayor cantidad de principio activo viable.

Para el caso de la síntesis se usaron como disolvente Etanol comercial (el que se compra en farmacias de uso para inyectar), bicarbonato de sodio (usado comúnmente para cocinar), sulfato de cobre anhidro (marca Merk) sulfato de cobre hidratado (uso comercial). Los espectros de IR fueron realizados en un equipo Bruker Tensor 27 en ATR.

Recuperación del principio activo:

Ya que se encontró en la literatura que la extracción se puede hacer con metanol, se procedió a realizar la extracción del fármaco a partir del medicamento caduco usando alcohol comercial para inyectar (del desnaturalizado al 70%). El procedimiento fue el siguiente: se colocaron 20mL de etanol comercial a calentar casi a evaporación (70°) y se le agregaron dos pastillas trituradas del medicamento caduco de metformina de 850mg. Se trató de disolver la mayor cantidad posible de medicamento en caliente y posteriormente se filtró en la misma temperatura. Al líquido filtrado se le evaporó el alcohol por calentamiento suave en parrilla. Se obtuvo polvo blanco que corresponde a la metformina recuperada. El rendimiento de recuperación es de 70%.

Formación del complejo:

La literatura indica la generación de los complejos usando hidróxido de potasio y reflujo en general para la generación del complejo de metformina con cobre ^[3,4]. Fujimori reporta la generación de aspirinato usando bicarbonato de potasio ^[2]. Por lo que se optó realizar la síntesis como se describe a continuación: Se disuelve 0.002 mol de bicarbonato de sodio comercial en 20 mL de agua, y se agrega 0.002 mol de metformina con agitación constante. A la disolución se le agrega 0.001 mol de sulfato de cobre, y se deja la reacción a temperatura ambiente con agitación constante por un lapso de 4 horas, generando un precipitado color rosa pálido el cual es filtrado a gravedad y secado a temperatura ambiente por 24 horas.

Para la generación del complejo azul, el procedimiento es el mismo y las proporciones se cambian, usando 0.004 mol de bicarbonato de sodio comercial en 20 mL de agua, 0.002mol de metformina y 0.001 mol de sulfato de cobre. El precipitado es color azul eléctrico.

RESULTADOS

Se corrieron placas de cromatografía en diversos disolventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y sus mezclas) para corroborar la pureza del compuesto recuperado, mostrando únicamente la marca de la metformina.

La metformina recuperada de los medicamentos caducos mostró las mismas bandas en IR con respecto a las reportadas en la literatura ^[5].

Los datos de las bandas principales se resumen a continuación:

Tabla 1. Vibraciones principales de metformina reportada en literatura ^[5, 19] y metformina recuperada.

Vibración en cm ⁻¹	Valor Reportado	Valor observado
<i>N-H imina</i>	3368.64	3390
<i>NH₂</i>	3159-3298	3153-3293
<i>C-N imina</i>	1562.81	1564.03
<i>C-N amina</i>	1210 / 1417	1167 / 1417
<i>Amina Primaria</i>	1624	1622
<i>C-H Alcano</i>	2983	3090
<i>-CH₃</i>	1474	1474

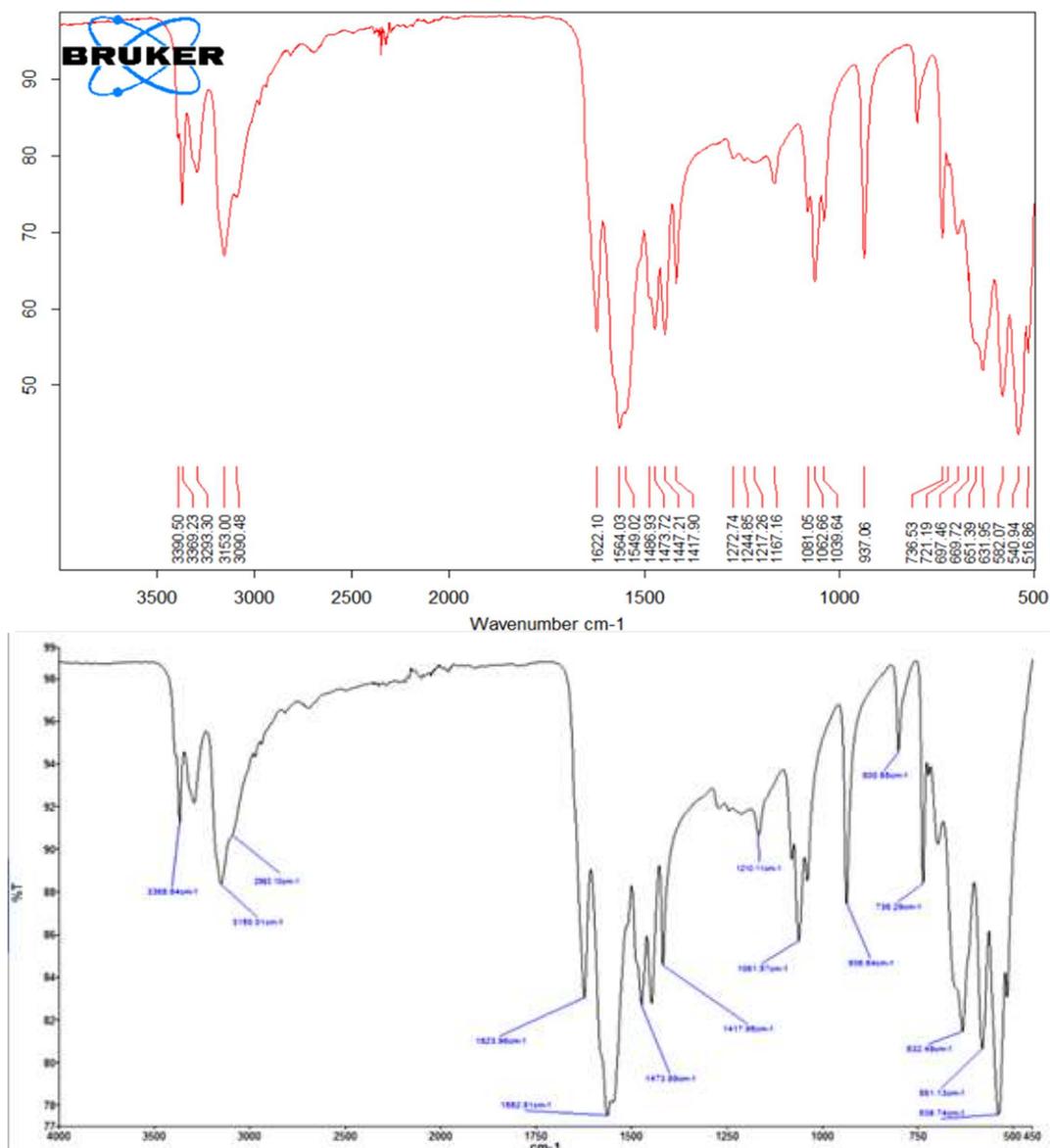


Imagen 1.- Espectros de metformina: en rojo el espectro de la metformina recuperada, en negro el espectro de metformina reportado en la literatura.

Con la metformina recuperada se procedió a la formación del complejo, observándose que una vez generado el complejo rosa se podía generar en la reacción el complejo azul agregando mayor cantidad de bicarbonato y sal de cobre, mientras que cuando se obtiene el complejo azul y se adiciona en la reacción mayor cantidad de metformina se desplaza la reacción a la producción del complejo rosa.

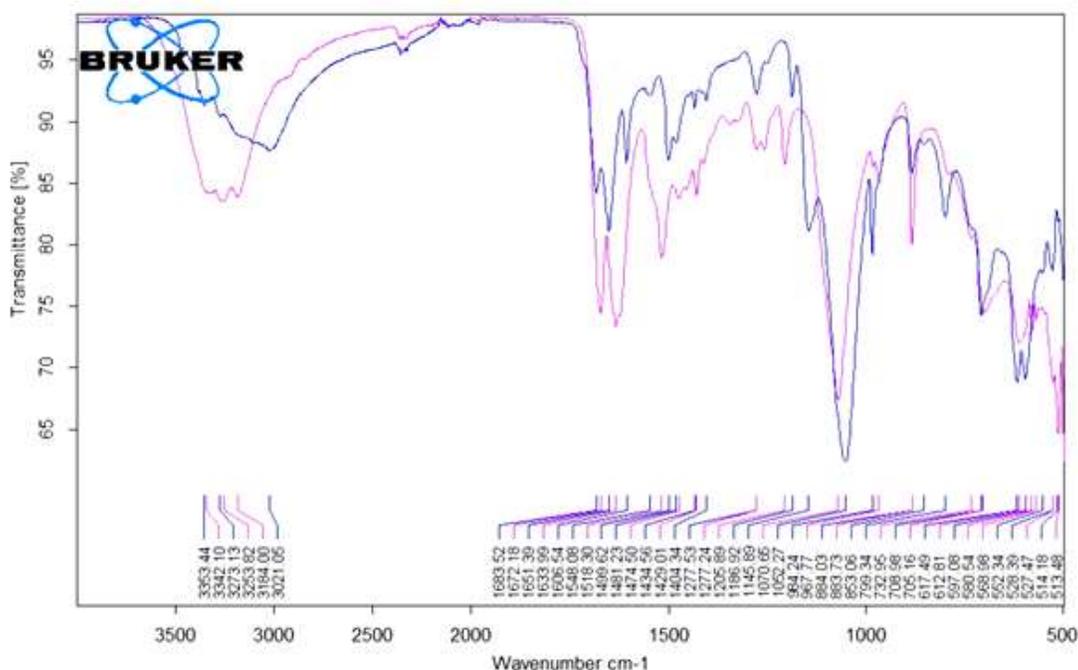


Imagen 2.- Espectros IR en ATR de los complejos, Espectro rosa correspondiente al complejo monomérico de cobre y el espectro en azul al complejo dimérico.

Tabla 2.- Señales observadas en IR reportadas para el complejo monomérico vs las obtenidas.

$\nu \text{ cm}^{-1}$	Reportado [3,4,19]	Observado
N-H	3340	3342, 3253, 3184
C-N	1612-1629	1672, 1633
C=N imina	1583-1626	1518
S=O		1070
M-N=C	812	883

Tabla 3.- Señales observadas en IR reportadas para el complejo dimérico vs las obtenidas

$\nu \text{ cm}^{-1}$	Reportado [19]	Observado
N-H	3373	3353
NH, NH2	3159, 3298	3273-3021
C-N amina	1583-1626	1606, 1683
C=N imina	1276-1419	1277 muy débil
S=O		1052
M-N=C	812	884

En ambos casos se observa la banda ancha correspondiente a vibración S-O del anión sulfato entre 1052 y 1070 cm^{-1} . El desplazamiento de la vibración C-N imina indica que la coordinación se lleva a cabo por el nitrógeno de la imina [3]. Con estos datos se proponen las estructuras siguientes:

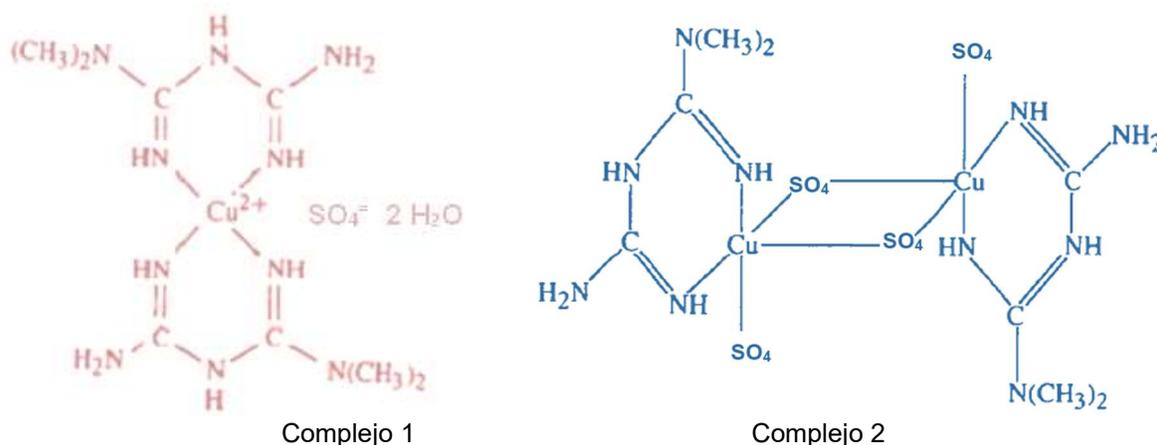


Figura 3.- Estructuras propuestas para los complejos obtenidos en relación con estructuras reportadas [4].

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que se puede recuperar de forma económica el principio activo de los medicamentos caducos, el cual conserva intacta su estructura y por ende sus propiedades. Se encontró una forma de generar dos metalofármacos de metforminato de cobre con uno y dos centros metálicos, dentro de la misma reacción, cuestión que no había sido observada hasta el momento. Los complejos obtenidos por método económico presentan las mismas características de aquellos reportados anteriormente usando métodos algo más sofisticados. Se tiene como meta a futuro el estudio más profundo de actividad biológica y posible aplicación de los complejos. Con este trabajo se propone la generación de los metalofármacos accesibles en costos y materiales a usar, para que en un futuro se puedan generar y usar en comunidades una vez probada su seguridad y actividad biológica, o bien puedan ser parte de una nueva generación de medicamentos con mayor actividad biológica y menores efectos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. O. Z. Lemus, J. S. G. González, M. C. H. Galindo, V. V. Pineda, A. M. López, y "Recolecta y clasificación de medicamentos caducados en la comunidad de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México durante 36 meses." *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, (2016), vol. 47, no. 3, pp.86-93. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956611008>.
2. T. Fujimori, S. Yamada, H. Yasui, H. Sakurai, Y. In, T. Ishida, "Orally active antioxidative copper(II) aspirinate: synthesis, structure characterization, superoxide scavenging activity, and in vitro and in vivo antioxidative evaluations", *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol.10, 2005, pp. 831-841.
3. N. M. Rao, M. M. Annapurna, "Copper and Nickel complexes of Metformin: Synthesis, Characterization and Pharmacodynamic Evaluation", *JASA*. (2007) 3. pp 43-46, DOI: 10.4324/9780203391150_chapter_3.
4. P. Lemoine, M. Chiadmi, V. Bissery, A. Tomas, B. Viossat, "Les Composés de la Metformine avec les Ions Co^{II} , Cu^{II} et Ni^{II} " *Acta Cryst.* (1996). C52, pp.1430-1436.
5. A. F. Figueroa, M. C. Báez, "Compendio de Espectros IR", Departamento ANAMED, Instituto de Salud Pública, pp 45-46.
6. J. Rojas, M. Chávez-Castillo, W. Torres, N. Arraiz, M. Cabrera, V. Bermúdez, "Metformin in Cancer: Chemical Pathways for Tumoral Control Independent of Amp-Dependent Kinase", *J. Endocrinol Diabetes Obes* (2014), 2(2):1036.
7. E. J. Baran, "Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina", *Anales Acad. Nac. De Cs. Ex., Fís. y Nat.*, (2014) Tomo 66, pp 5-21.

8. C. Mejía, S. Ortega-Rosales, L. Ruiz-Azuara, Biomedical Applications of Metals, Mechanism of Action of Anticancer Metallodrugs, pp 213-234.
9. A. Latif Abuhijleh, "Mononuclear and binuclear copper(II) complexes of the antiinflammatory drug ibuprofen: Synthesis, characterization, and catecholase-mimetic activity", Journal of Inorganic Biochemistry, Volume 55, Issue 4, September 1994, pp 255-262.
10. E. Chalkidou, F. Perdih, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, "Copper(II) complexes with antimicrobial drug flumequine: Structure and biological evaluation" Journal of Inorganic Biochemistry 113 (2012) pp 55–65.
11. Manual para el tratamiento y disposición final de medicamentos y fármacos Caducos, CENAPRED - INE, Diciembre 1995, Publicaciones del Instituto Nacional de Ecología.
12. Medicamentos Caducos ¡A limpiar botiquines!, PROFECO Informa, Revista del Consumidor, Noviembre 2007.
13. M.A. Valtierra-Alvarado, M. R. González-Ponce, J. J. N. Segoviano-Garfias, "Estudios de asociación de complejos cobre(II)-metformina y su interacción con haluros para su potencial aplicación en diabetes II", Jóvenes en la ciencia, (2014), vol. 1, no.1, pp 117-125. Archivo descargado desde <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/599/pdf3>
14. A.G. Anderson, J. Feaster, D. Patel, M. Scialdone, "Ibuprofen complexes as wood preservatives", US patent 7462227, issued 2007-07-26.
15. A.D. Williams, T.D. Walz, O.W. Foye (1976) J Pharm Sci 65:126–128.
16. F. Al-Saif, M. Refat, "Synthesis, spectroscopic, and thermal investigation of transition and non-transition complexes of metformin as potential insulin-mimetic agents", Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, (2013) Vol.111, Marzo, pp. 2079-2096.
17. S. Villamizar-Delgado, "Síntesis y caracterización de metalofármacos obtenidos a partir de metformina con Cu^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} y Bi^{+2} , con potencial uso para el tratamiento del sobrepeso" Tesis, Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Cali, Colombia, 2019.
18. M. Zhu, L. Lu, P. Yanga, X. Jin, "Bis(1,1-dimethylbiguanido)copper(II) octahydrate", Acta Cryst. (2002). E58, m217-m219.
19. B. F. Abbas, B. A. F. Kamel, W. M. Khamais, "Preparation, Diagnosis, Biological Activity, and Theoretical Studies of Some Mixed Drug Complexes", Hindawi, e Scientific World Journal, Volume 2019, Article ID 8962923, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/8962923>

EFFECTO DEL SDHEA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR SULFITO DE SODIO SOBRE LA OVOPOSICIÓN EN EL ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS

Leonardo Hernandez-Hernandez¹, Diego Wenceslao Aguilar Ocampo², Roberto Chavez Mantilla³, Manuel de Jesus Gallegos Saucedo⁴, Rafael Cortés-Zárate⁵, Araceli Castillo-Romero⁵, Jacinto Bañuelos-Pineda⁶ y Gabriela Camargo-Hernández⁷

¹Departamento de Fisiología. CUCS-Universidad de Guadalajara, ²CUCEI-Universidad de Guadalajara, ³CUCBA-Universidad de Guadalajara, ⁴Doctorado en Farmacología. CUCS-Universidad de Guadalajara, ⁵Departamento de Microbiología y Patología. CUCS-Universidad de Guadalajara, ⁶Departamento de Medicina Veterinaria. CUCBA-Universidad de Guadalajara, ⁷Departamento de Ciencias de la Salud. CUALTOS-Universidad de Guadalajara.

leohhdez@hotmail.com

RESUMEN

La hipoxia, es decir, niveles demasiado bajos de oxígeno capaces de sustentar las funciones normales, ocurre en un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Particularmente, puede causar severa disfunción del sistema nervioso central (SNC) mediante la muerte neuronal. A nivel celular no se conoce el mecanismo de acción por el cual los Neuroesteroides como DHEA pueden conferir protección contra el daño inducido por hipoxia, toda vez que la respuesta celular a hipoxia no ha sido del todo aclarada. La investigación en neuroprotección se han sustentado en trabajos con modelos animales, incluyendo al *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El *C. elegans*, es uno de los organismos más simples con un sistema nervioso que realiza muchas funciones similares a las de los sistemas nerviosos de organismos más complejos. Particularmente posee los componentes de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico presentes en vertebrados y su actividad puede ser estudiada a través de conductas estereotipadas como la ovoposición. Además, el *C. elegans* responde a la hipoxia con vías y procesos celulares conservados en mamíferos. aquí implementamos un modelo de hipoxia química con Sulfito sódico (SS, Na₂SO₃), que emula los procesos fisiopatológicos de la hipoxia física. El Objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del SDHEA sobre el daño inducido por sulfito de sodio sobre la ovoposición en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. En este estudio se utilizaron nemátodos de la cepa N2 (Wild Type) de edad sincronizada cultivados en placas de agar-NGM a 19°C. Establecimos un grupo no tratado (CTL), un grupo hipóxico (SS), un grupo hipóxico con SDHEA (SS+SDHEA), un grupo hipóxico tratado con Dopamina (SS+DOP), un grupo hipóxico tratado con Serotonina (SS+SER) y un grupo tratado solo con SDHEA (SDHEA). La hipoxia se indujo exponiendo a los gusanos a SS por 16h a 20°C, con un reposo posterior de 24h a 20°C en NGM-OP50. Para observar la conducta de ovoposición se trasladaron un número constante de gusanos a cajas de Agar NMG con alimento (cepa *E. coli* OP50), y se contabilizaron los huevos depositados en la superficie de la placa después de una hora. Encontramos que el SDHEA revirtió completamente la reducción del 50% en la ovoposición inducida por la SS y que la dopamina exógena no mostró diferencias significativas con el CTL, y Serotonina exógena sí provocó un aumento significativo de la ovoposición con el CTL. Los resultados observados sugieren que el SDHEA confiere protección contra el daño oxidativo a los sistemas involucrados en la ovoposición del nematodo *C. elegans*, principalmente la vía dopaminérgica, probablemente por su actividad antioxidante o su acción neurotrófica o por la combinación de ambas.

INTRODUCCIÓN

Aun cuando la hipoxia se produce en numerosos procesos fisiológicos, es una causa importante de daño y muerte celular (1). Cabe señalar que la sensibilidad de las células y los organismos a la lesión hipóxica varía ampliamente (2). particularmente el Sistema Nervioso Central (SNC) podría sufrir lesiones graves (3, 4). Se ha reportado que la hipoxia ejerce efectos diferenciales sobre la síntesis de dopamina y serotonina (5) en diferentes regiones del sistema nervioso. Los niveles de estos neurotransmisores en particular son relevantes cuando están relacionados con trastornos como la ansiedad, la depresión y la esquizofrenia. Consiguientemente, es importante investigar los

antecedentes celulares y genéticos de la respuesta a la hipoxia y avanzar en nuestra comprensión de cómo los animales se adaptan a los niveles cambiantes de oxígeno durante el desarrollo, la homeostasis y la enfermedad. A este respecto, los esteroides neuroactivos se ha reportado podrían conferir protección contra algunos procesos hipóxicos en mamíferos (6, 7), sin embargo, a nivel celular, se desconoce el mecanismo de acción exacto ya que la respuesta a la hipoxia aún no se ha dilucidado por completo. Particularmente, la Dehidroepiandrosterona (DHEA) y su éster de sulfato (SDHEA) ha mostrado efectos beneficiosos en procesos hipóxicos inducidos por hipertensión arterial pulmonar y la mejora de la función vascular sistémica. Se ha postulado que los mecanismos de acción de SDHEA se presentan en dos formas diferentes, una indirecta, tras su conversión a esteroides sexuales en los tejidos periféricos, y otra directamente en el cerebro, al interactuar con receptores de neurotransmisores (8). También otros informes han sugerido que la DHEA y sus derivados ejercen sus acciones a través de la actividad neurotrófica (9, 10) o por una actividad antioxidante y antiinflamatoria (11, 12).

TEORÍA

Se requiere una investigación que considere la gran diversidad e integración de las respuestas celulares a la hipoxia. Dado que los estudios en mamíferos vivos son experimentalmente complicados debido a la dificultad de medir o controlar las concentraciones celulares de O_2 (13), aquí empleamos un modelo de hipoxia en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* es un organismo que tiene procesos celulares y moleculares conservados en animales superiores, particularmente mamíferos, y debido a su simplicidad, transparencia, facilidad de cultivo, proporciona un modelo rentable, in vivo y efectivo, si la enfermedad se puede definir sobre una base molecular (14). En *C. elegans*, es posible el control preciso del O_2 celular, ya que todas sus células están expuestas al ambiente gaseoso (15). Además, la respuesta hipóxica de *C. elegans* involucra redes reguladoras y procesos celulares conservados en mamíferos. En este trabajo, aplicamos un modelo químico de hipoxia con sulfito de sodio que emula los procesos físicos de hipoxia y, por lo tanto, simula el entorno hipóxico y causa lesiones relacionadas con la hipoxia en células animales (16). En el *C. elegans* la administración exógena de la dopamina y la serotonina ejercen efectos contrapuestos sobre la ovoposición, mientras que la Dopamina la inhibe (17, 18), la serotonina la estimula (18-21). Así pues, utilizamos a la conducta estereotipada de ovoposición como un indicador indirecto de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica. Así pues, en este estudio se evaluó la conducta estereotipada de ovoposición y su relación con algunos posibles mecanismos moleculares que regulan la homeostasis del oxígeno. Además, al probar el efecto del SDHEA sobre el daño inducido por sulfito de sodio sobre la ovoposición en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, podríamos obtener información predictiva sobre la interacción fármaco-objetivo y validar una posible estrategia terapéutica.

PARTE EXPERIMENTAL

Cepas de *C. elegans*

En este estudio se utilizaron nemátodos de la cepa N2 (Wild Type) del tipo Bristol que se obtuvieron del *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, EUA). Todos los experimentos se realizarán sobre animales sincronizados en la etapa adulta según métodos estándar (22).

Métodos de Cultivo

Los stocks de las cepas de gusanos fértiles fueron cultivados, de acuerdo con técnicas estándar, en placas de Petri con Agar-NGM mantenidas a un rango de temperaturas entre 16 y 19°C con *Escherichia Coli* de la cepa OP50 como fuente de alimento (22).

Ensayos de supervivencia

C. elegans de la cepa N2 Bristol (WT) se transfirieron a placas de 96 multipocillos de fondo redondo y fueron expuestos a las diferentes concentraciones de los compuestos SDHEA, dopamina y serotonina (siguiendo una escala logarítmica) disueltos en M9. De ahí se contaron el número de gusanos muertos y vivos, cada hora por cinco horas. Se registraron a los gusanos como vivos si mostraron movimiento voluntario y muerto si no lo hicieron. Con estos datos se elaboraron curvas

de supervivencia de Kaplan-Meier, con las que establecimos las concentraciones de trabajo más adecuadas para estos compuestos, considerando el mayor efecto con el mínimo daño infringido tras la exposición. Se realizaron los experimentos por triplicado.

Protocolo de exposición a Sulfito de Sodio

El modelo de hipoxia química, se realizó de acuerdo a lo descrito por Jiang y colaboradores (16). Brevemente los nematodos de la cepa N2 Bristol (WT) fueron transferidos a placas de 96 multipocillos de fondo redondo y expuestos a sulfito de sodio (SS, 1g/L en buffer M9) durante 16 Horas y posteriormente fueron transferidos a placas NGM con alimento (*E. coli* OP50) y se les permitirá reposar por 24 horas a 20°C.

Grupos de Estudio

Para estudiar el efecto del SDHEA, Dopamina y Serotonina sobre el daño causado por hipoxia química sobre la neurotransmisión Dopaminérgica y Serotoninérgica a través de la cuantificación de la ovoposición, se establecieron un grupo control (CTL) que no recibió ningún tratamiento y 4 grupos de estudio: un grupo hipóxico (SS) donde los nematodos fueron sometidos al protocolo de exposición a Sulfito de Sodio, un grupo hipóxico con SDHEA (SS+SDHEA), donde los gusanos fueron sometidos al protocolo de exposición a Sulfito de Sodio y tratados al mismo tiempo con SDHEA, un grupo hipóxico con Dopamina (SS+DOPA), donde los animales se sometieron al protocolo de exposición a Sulfito de Sodio y un media hora antes del análisis de la conducta de ovoposición, se les trató con dopamina, un grupo hipóxico con Serotonina (SS+SER), donde los animales fueron sometido al protocolo de exposición a Sulfito de Sodio y un media hora antes del análisis de la conducta de ovoposición, se les trató con serotonina, y finalmente un grupo tratado solo con SDHEA (SDHEA).

Análisis de conducta de ovoposición

A fin de evaluar la condición de la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica se realizará una cuantificación de la ovoposición de los gusanos de los diferentes grupos de estudio. Para esto, los nematodos una vez sometidos a su tratamiento respectivo fueron trasladados (5-10 por grupo) a cajas de Agar NGM con alimento (cepa *E. coli* OP50), y se contabilizarán los huevos depositados en la superficie de la placa en una hora. Los resultados se normalizaron con respecto al control.

Análisis Estadístico.

Todos los gráficos y los análisis estadísticos fueron hechos con el software SigmaPlot 11.0. Los resultados se reportan como media \pm error estándar de la media. Los estudios de supervivencia se analizaron mediante la prueba de supervivencias de Kaplan-Meier y fueron ponderadas con pruebas de log-Rank, la diferencia entre curvas se estimó con la prueba post-hoc de Holm-Sidak. Para los ensayos de ovoposición, en comparaciones de medias de 3 o más grupos, los datos se analizaron mediante un ANOVA de una sola vía con la prueba post hoc de DSM (Diferencia Significativa Mínima) de Fisher si seguían una distribución normal y tenían la misma varianza. Si no, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn. En la comparación de medias de dos grupos se analizaron con la prueba t o la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Determinación de las concentraciones de trabajo a través de la tasa de supervivencia.

Encontramos que las concentraciones probadas de SDHEA no inducen más del 10% de la mortalidad de los gusanos después de 5 horas de exposición, ni fueron estadísticamente diferentes del control (Figura 1A, LogRank $p = 0.340$, $n = 114$), fue un efecto independiente de la dosis pues concentraciones de 0.01 mM y 1 mM mostraron una tasa de supervivencia menor que las concentraciones de 0.001 mM, 0.1 mM y control. Así, elegimos SDHEA 0.1 mM, que resultó ser el más similar a este último. Esta concentración demostró exhibir suficiente capacidad antioxidante para aumentar significativamente la tasa de supervivencia a la exposición a peróxido de hidrógeno 0.5 mM (Figura 1B, LogRank $p < 0.001$, $n = 90$) después de 5 horas de exposición. En el caso del

Sulfito de Sodio, se utilizó una solución con una concentración de 1 g/L preparada con buffer M9, con base al artículo de Jiang y colaboradores (16) que demostraron que Sulfito de Sodio 1 g/L es capaz de mantener el oxígeno disuelto en 0.1 mg/L, por al menos 40 horas en soluciones acuosas. En relación con la Dopamina, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que todas las concentraciones probadas disminuían significativamente las tasas de supervivencia (Figura 1C, LogRank $p < 0.001$, $n = 200$). Dopamina 0.1 mM fue la elegida para la concentración de trabajo tener la tasa de supervivencia más alta en las concentraciones probadas. Con la Serotonina, las curvas de Kaplan-Meier muestran que todas las concentraciones probadas (0.01 mM a 1 mM) de un modo dependiente de la dosis. En este caso, se eligió la concentración de 0.01 mM, que mostro la tasa de supervivencia más alta, significativamente diferente que el control (Figura 3B, LogRank $p < 0.001$, $n = 200$).

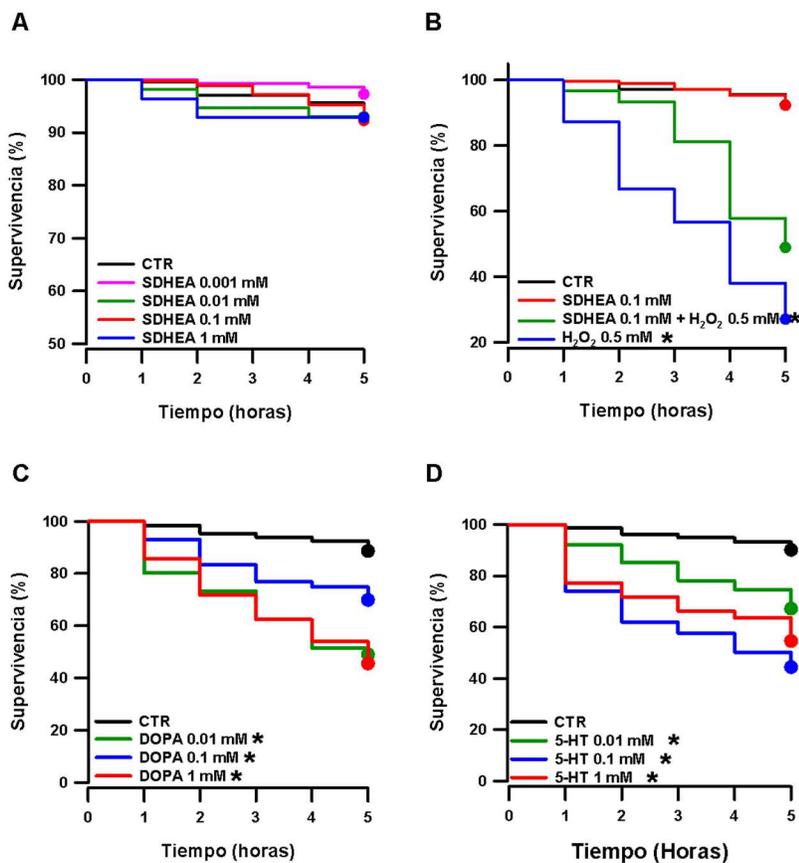


Figura 1. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para concentraciones de SDHEA 0.001 mM a 1 mM (A), para el efecto de SDHEA (100 μ M) sobre la supervivencia a 0.5 mM de Peroxido de Hidrogeno (B), para concentraciones de Dopamina 0.01 mM a 1 mM (C,) y para el efecto de Serotonina 0.01 mM a 1 mM (D). * $P < 0.001$ vs CTL,

Efecto de la Hipoxia química, inducida con la exposición Sulfito de Sodio, sobre la neurotransmisión Dopaminérgica y Serotoninérgica a través de la cuantificación de la ovoposición.

Los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico influyen en la conducta estereotipada de ovoposición. En este sentido, la administración exógena de la dopamina y la serotonina ejercieron efectos contrapuestos, la dopamina 0.1 mM (DOPA) disminuyo la ovoposición en un 48.3 ± 7.4 % y la Serotonina 0.01 mM (5-HT) la aumento en un 51.9 ± 20 %, ambas con relación al control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 2, ANOVA de una VIA, $p = 0.008$, $n=25$).

Hipotetizamos que el daño hipóxico podría deteriorar estos sistemas de neurotransmisión, por lo que evaluamos el efecto que la hipoxia química tiene sobre la ovoposición. En este caso, observamos que la exposición a SS disminuyó 47.5 ± 4.9 % la ovoposición, lo que fue significativamente menor al control (Figura 2, U de Mann-Whitney, $p = 0.002$, $n=22$). Posteriormente a gusanos expuestos a Sulfito de Sodio 1 g/L se les trató con Dopamina 0.1 mM (SS + DOPA) o con Serotonina 0.01 mM (SS + 5-HT). Los gusanos SS + DOPA no fueron significativamente diferentes al control (Figura 2, ANOVA de una VIA, $p = 0.701$ $n=15$), pero su ovoposición fue significativamente mayor (41.6 %) a los tratados con DOPA (Figura 2, ANOVA de una VIA, $p = 0.701$ y $p = 0.046$ respectivamente, $n=15$). Por su lado, el grupo SS + 5-HT, no mostró cambio en relación con el tratamiento con 5-HT, pero sí fue 40.5 % mayor que la ovoposición del CTL (Figura 2, ANOVA de una VIA, $p = 0.616$ y $p = 0.039$ respectivamente, $n=15$).

Efecto del SDHEA sobre el daño causado por la hipoxia química sobre la neurotransmisión Dopaminérgica y Serotoninérgica a través de la cuantificación de la ovoposición.

Nematodos expuestos a Sulfito de Sodio 1 g/L, se les trató con SDHEA 100 μ M (SS + SDHEA) y también se trataron gusanos únicamente con SDHEA. Así, los gusanos SS + SDHEA mostraron una ovoposición muy similar al control, pero significativamente más abundante que los nematodos SS (Figura 2, Kruskal-Wallis de una VIA, $p = 0.006$, $n = 22$). Asimismo, el grupo de SDHEA no fue diferente al control, lo que sugiere que el SDHEA por sí solo no tiene efecto sobre la ovoposición.

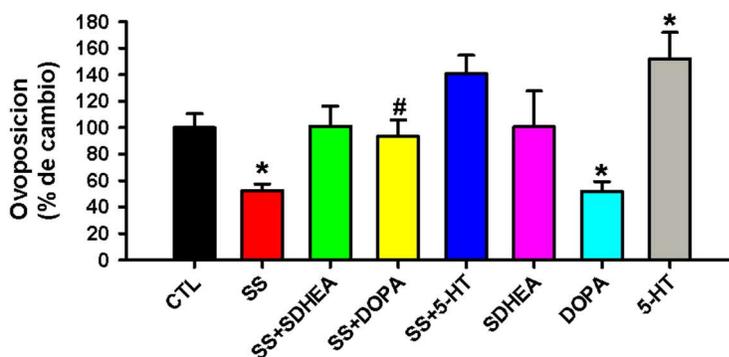


Figura 2. SDHEA y Daño de la Hipoxia química sobre la. * $P < 0.05$ vs CTL grupo y # $P < 0.05$ vs DOPA

CONCLUSIONES

En este trabajo encontramos, como se ha reportado previamente, que la dopamina y la serotonina ejercen efectos contrastados sobre la ovoposición, por lo que esta conducta estereotipada es un indicador indirecto de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica en el nematodo *C. elegans*.

También se demostró que la hipoxia química limita el efecto inhibitorio del tratamiento con dopamina exógena sobre la ovoposición y no modificó el efecto estimulador de la serotonina sobre la misma ovoposición.

Además, nuestros resultados muestran la hipoxia química deteriora la ovoposición en los gusanos, sin embargo, este efecto parece ser independiente de la actividad serotoninérgica y dopaminérgica. Finalmente se observó que, aunque el SDHEA no tiene efecto alguno sobre nematodos adultos intactos, sí revertió efecto de la hipoxia química sobre la ovoposición.

BIBLIOGRAFIA

1. T. G. Nystul, M. B. Roth, Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9133-9136 (2004).
2. L. L. Anderson, X. Mao, B. A. Scott, C. M. Crowder, Survival from hypoxia in *C. elegans* by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases. *Science* **323**, 630-633 (2009).
3. J. M. Brown, Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* **6**, 157-162 (2000).
4. M. Hallett, Physiology of human posthypoxic myoclonus. *Mov Disord* **15 Suppl 1**, 8-13 (2000).
5. G. K. Kumar, Hypoxia. 3. Hypoxia and neurotransmitter synthesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **300**, C743-C751 (2011).
6. A. Kaasik, A. Kalda, K. Jaako, A. Zharkovsky, Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience* **102**, 427-432 (2001).
7. P. A. Lapchak, D. F. Chapman, S. Y. Nunez, J. A. Zivin, Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke* **31**, 1953-1956; discussion 1957 (2000).
8. B. Alolio, W. Arlt, DHEA treatment: myth or reality? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **13**, 288-294 (2002).
9. N. A. Compagnone, S. H. Mellon, Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4678-4683 (1998).
10. N. P. Goncharov, G. V. Katsya, Neurosteroid dehydroepiandrosterone and brain function. *Hum Physiol* **39**, 667-674 (2013).
11. G. Rammouz, L. Lecanu, V. Papadopoulos, Oxidative stress-mediated brain dehydroepiandrosterone (DHEA) formation in Alzheimer's disease diagnosis. *Frontiers in Endocrinology* **2**, (2011).
12. N. Maninger, O. M. Wolkowitz, V. I. Reus, E. S. Epel, S. H. Mellon, Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (SDHEA). *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 65-91 (2009).
13. E. M. Fawcett, J. M. Hoyt, J. K. Johnson, D. L. Miller, Hypoxia disrupts proteostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **14**, 92-101 (2015).
14. S. Brenner, The genetics of *caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94 (1974).
15. C. Shen, J. A. Powell-Coffman, Genetic analysis of hypoxia signaling and response in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 191-199 (2003).
16. B. Jiang *et al.*, Sodium sulfite is a potential hypoxia inducer that mimics hypoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Inorg Chem* **16**, 267-274 (2011).
17. W. R. Schafer, C. J. Kenyon, A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**, 73-78 (1995).
18. D. Weinshenker, G. Garriga, J. H. Thomas, Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J Neurosci* **15**, 6975-6985 (1995).
19. H. Horvitz, M. Chalfie, C. Trent, J. Sulston, P. Evans, Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **216**, 1012-1014 (1982).
20. J. Mendel *et al.*, Participation of the protein Go in multiple aspects of behavior in *C. elegans*. **267**, 1652-1655 (1995).
21. L. E. Waggoner, G. T. Zhou, R. W. Schafer, W. R. Schafer, Control of alternative behavioral states by serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **21**, 203-214 (1998).
22. I. A. Hope, *C. elegans: A Practical Approach*. I. A. Hope, Ed., Practical Approach Series (Oxford University Press, Oxford ; New York, ed. 1 edition, 1999), vol. 213.

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE FORMACION DE $[Zn(BNZD)_2(NCS)_2(OH_2)_2]$ CON Pb (II) Y Sn (II) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE LUMINISCENCIA EN MEDIOS ORGANICOS POLARES

Luis Diego Casas Lázaro, Andrea Cruz Granados, Alejandro García Bárcenas, Alejandro Núñez Vilchis, Maricela González Leal y Adrian Sosa Domínguez

Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
luis7casas7@gmail.com

RESUMEN

Recientemente se ha desarrollado el compuesto de coordinación $[Zn(BnzD)_2(NCS)_2(OH_2)_2]$, el cual posee las características para ser utilizado como un quimiosensor de múltiples iones metálicos, siendo altamente selectivo a Pb (II) y Sn (II) en un medio acuoso, lo que lo hace de gran interés de estudio. Las constantes de formación son un parámetro analítico que indica la estabilidad con la que se forma un complejo, pudiendo conocerse en base a esos valores si dicho complejo se favorece o no a formarse en la reacción. Estos valores dependen del medio, por lo que, de buscar utilizarse en otro disolvente, debe evaluarse su comportamiento en dicho disolvente. La finalidad del proyecto fue determinar las constantes de formación de los complejos formados entre el quimiosensor y los iones metálicos de interés en medios de reacción diferentes al agua, para así tener disponibles los parámetros analíticos para posibles futuros usos en el desarrollo de metodologías para la detección de estos iones metálicos en los mismos disolventes. Se formó el complejo BCc y el complejo-metal. Se midieron las longitudes de onda de máxima emisión y excitación y se registraron los espectros. De los espectros obtenidos se construyeron los gráficos de Job para la determinación de la estequiometría de la reacción de complejación entre el BCc y el ion metálico correspondiente, y el gráfico del modelo lineal de Hill, del cual se obtuvo la constante de formación condicional. Se evaluaron las constantes de formación condicionales de este compuesto de coordinación con Pb (II) y Sn (II) en metanol y acetonitrilo. Se encontró que los complejos formados entre el quimiosensor y el ion Pb (II) en los medios trabajados son inestables, pues se favorece más la formación de otra especie diferente a la estudiada. Este estudio permitió conocer que el quimiosensor puede utilizarse en metanol y acetonitrilo para la detección de Sn (II) mientras que no se puede utilizar para detección de Pb (II).

INTRODUCCION

El compuesto de coordinación $[Zn(BnzD)_2(NCS)_2(OH_2)_2]$, recientemente preparado, posee las características adecuadas para ser utilizado como un quimiosensor de múltiples iones metálicos, siendo selectivo a Pb (II) y Sn (II) en un medio acuoso y esto lo hace de gran interés de estudio. La finalidad del proyecto fue determinar las constantes de formación de los complejos formados entre el quimiosensor y los iones metálicos de interés en medios de reacción diferentes al agua, debido a que estas constantes de formación son un parámetro analítico que indica la estabilidad con la que se forma un complejo, y conociendo los valores se sabe si el complejo se favorece o no a formarse en la reacción. Estos valores dependen del medio, por lo que, de buscar utilizarse en otro disolvente, debe evaluarse su comportamiento en el mismo.

TEORIA

Los quimiosensores son dispositivos moleculares que transforman información química en señales analíticas, como pueden ser eléctricas, electrónicas, magnéticas u ópticas. Al reconocer el analito mediante una reacción o enlace, se produce un cambio en las propiedades del sensor, estos cambios pueden ser cualitativos, lo que da una gran ventaja en la detección de iones, ya que se puede obtener una respuesta rápida y en el sitio, sobre la presencia del ion de interés, sin la necesidad de realizar alguna técnica instrumental [1].

El uso de quimiosensores para detectar un solo ion son los más abarcados en el planteamiento de nuevas metodologías para la detección de iones metálicos en sistemas biológicos, ya que pueden resultar tóxicos si se presentan cantidades altas. Hay iones de metales pesados que también son de

preocupación ambiental, como es el plomo, que tiene impacto en el cuerpo y el ambiente, por ello su detección temprana es deseable. Esto es una preocupación en la que el uso de los quimiosensores resulto ser de gran éxito en la identificación de un solo ion con un solo sensor [2].

Con el uso e incremento en la investigación de los quimiosensores se ha llegado al planteamiento de desarrollo de variantes que son selectivas a múltiples iones, que poseen la capacidad de detectar a más de un ion con una sensibilidad adecuada, pues de obtenerse dichos sensores, se reducirían costos y tiempos de análisis. Estos sensores son capaces de detectar selectivamente más de un ion en específico, pudiendo ser o no la detección simultánea [2].

Los quimiosensores fluorescentes son desarrollados como una importante herramienta en la detección de especies, como los metales de transición, pues poseen selectividad, sensibilidad y tiempos cortos de respuesta. Estos poseen dos características esenciales, deben tener un quelante de metales o un radical enlazante y al menos un fluoróforo capaz de absorber y emitir luz. Para funcionar como un sensor, el enlace metálico debe alterar la estructura electrónica o molecular del quimiosensor, los cambios electrónicos producen un cambio en la intensidad o la longitud de onda de emisión, mientras que los moleculares producen un cambio en la distancia u orientación entre los fluoróforos que sirven de par donador o receptor [1]. Una vez que el analito ha sido detectado por uno de estos sensores, el cambio en la señal fluorescente puede observarse por medio de tres mecanismos de detección, los cuales son desactivación fluorescente, producida por quelación, amplificación de la misma o un cambio en la fluorescencia máxima [1], [9]. En la actualidad los sensores del mecanismo de desactivación fluorescente por quelación son los más comunes cuando se trata de la identificación de metales de transición, sin embargo, el uso y desarrollo de sensores basados en el mecanismo de la amplificación fluorescente es más deseado, debido a que éstos poseen mejores selectividades y sensibilidades en comparación con los demás mecanismos [4].

Recientemente se desarrolló el compuesto de coordinación fluorescente con el mecanismo de amplificación de intensidad, $[Zn(Bnzd)_2(NCS)_2(OH_2)_2]$, abreviado BCc, el cual es un compuesto sólido cristalino estable de base bencidina, que en años recientes comenzó a estudiarse por las propiedades fotoluminiscentes de la bencidina, demostrando poseer las características necesarias para utilizarse como un quimiosensor de múltiples iones metálicos, en su caso, resulta ser altamente selectivo a los iones $Pb(II)$ y $Sn(II)$ en un medio acuoso, pudiendo detectar ambos en concentraciones por debajo de los límites permisibles, sin presentar interferencias por parte de otros iones metálicos comunes, lo que lo hace especialmente atractivo de estudiar [4].

En la estructura, las bencidinas actúan como fluoróforos, siendo las aminas los receptores, por sus pares electrónicos libres (Figura 1).

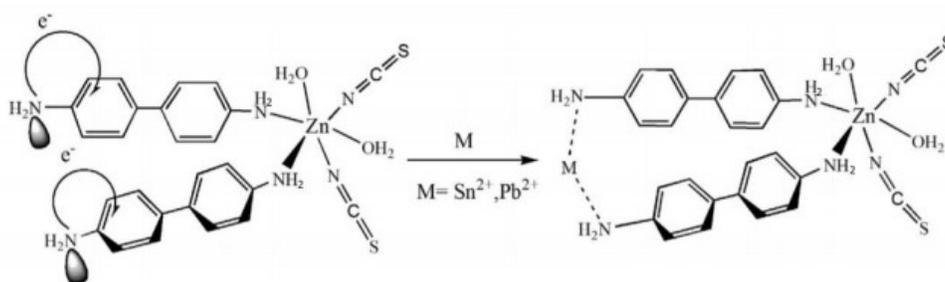


Figura 1. Mecanismo de detección del quimiosensor BCc

Los parámetros y comportamiento del quimiosensor BCc, se conocen en un medio acuoso micro heterogéneo, consistente de una relación de volumen 1:9 de dimetilsulfóxido y agua. Este es un medio favorable para la optimización de las propiedades luminiscentes, lo que lo hace el más indicado para evaluar a un quimiosensor y también por su selectividad [4]. Aunque este es utilizado en algunas metodologías analíticas, su uso no es frecuente en procesos de otras áreas.

Constantes de formación

Las constantes de equilibrio permiten conocer la estabilidad y las concentraciones al equilibrio de las especies de una reacción, cuando estas especies son del tipo anfitrión y huésped, forman un complejo unido por fuerzas intermoleculares débiles, la constante de equilibrio es entonces llamada constante de formación. Dichas constantes son parámetros que permiten conocer la estabilidad con la que se produce un complejo, un valor grande indica que se favorece dicha formación, mientras que un valor pequeño indica lo contrario. La magnitud de la constante es específica para cada sistema, en el cual, las variables que pueden modificarla son la temperatura, el pH y el medio de reacción [5]. Antes de cualquier determinación de la constante de formación, es esencial determinar la estequiometría del complejo anfitrión-huésped, esto se realiza mediante el método de variaciones continuas [3], que consiste en la preparación de una serie de disoluciones que contienen ambos reactivos en proporciones variables, pero donde el total es siempre constante. La señal medida se grafica en contra de la fracción molar del huésped [8]. Una variación de dicho método es la linealización del gráfico y de la expresión de la intensidad fluorescente total, de manera que se obtiene un gráfico lineal con la expresión de la Ecuación 1.

$$\log\left(\frac{F-F_0}{F_{max}-F}\right) = n \log[M^{m+}] + \log K_f \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde n es el coeficiente de Hill y se relaciona con la cooperatividad de enlace causada por la presencia de los iones, F_0 es la intensidad de emisión cuando no está presente el ion metálico, F_{max} es la intensidad de emisión en presencia de la máxima concentración del ion metálico, F es la intensidad de emisión tras la adición de una concentración inicial conocida y K_f se trata de la constante de formación del complejo [4].

Disolventes orgánicos polares

Al utilizarse disolventes orgánicos, estos presentan la propiedad de ser próticos o apróticos. Los disolventes próticos, contienen hidrógenos unidos a oxígeno o nitrógeno de modo que son lo suficientemente ácidos como para formar puentes de hidrógeno, mediante estos puentes se solvatan los aniones fuertemente. Así se estabilizan los aniones, disminuyendo su reactividad. Los alcoholes, son disolventes próticos que se han utilizado tradicionalmente en aquellos casos en que se precisa a la vez la solubilización de sustratos orgánicos e inorgánicos. Existen varias razones para su uso, entre las que están la asequibilidad de los alcoholes, el conocimiento común de los mismos y la facilidad de obtener dichos disolventes. Los disolventes apróticos, son compuestos que presentan una polaridad elevada y pueden solvatar en sustancias polares, compuestos iónicos, pero de una manera diferente a los disolventes próticos, ya que son incapaces de formar puentes de hidrógeno con los aniones, pues no poseen ningún protón fácilmente disociable, no reduciéndose la reactividad del anión. Un ejemplo de estos disolventes es el acetonitrilo y el catión, mientras que el anión se haya libre de solvatación, en un estado bastante reactivo [7]. El uso de disolventes diferentes al agua es importante, pues existen procesos que utilizan otros disolventes, como son los alcoholes, principalmente el metanol, los cuales se utilizan en procesos de producción de tintes, resinas, adhesivos y combustibles, mientras otros como el acetonitrilo se utilizan industrialmente en la producción de farmacéuticos, donde es importante la detección de iones metálicos pesados que pueden ser de riesgos a la salud o el ambiente de encontrarse en los productos [1]. Estos disolventes son orgánicos polares, en los cuales los compuestos base bencidina son solubles [6].

La determinación de las constantes de formación de estos complejos con los iones de interés en medios no acuosos, es de gran importancia, pues se enriquece la cantidad de constantes reportadas y permite el uso del sensor al conocerse su estabilidad en la formación de complejos con los iones a los que es selectivo y el desarrollo de nuevas metodologías en los medios propuestos.

HIPÓTESIS

El uso de diferentes disolventes interfiere en la estabilidad de los complejos, modificando las constantes de formación del compuesto de coordinación con los iones metálicos.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar las constantes de formación de los complejos del compuesto de coordinación BCc con los iones metálicos Pb (II) y Sn (II) en metanol y acetonitrilo.

Objetivos específicos.

a) Determinar la longitud de onda de máxima emisión y excitación en el espectrofotómetro de luminiscencia para los complejos formados en metanol y acetonitrilo.

b) Observar la influencia del medio en la formación de los complejos, en un medio polar (prótico) y uno no polar (aprótico).

c) Calcular las constantes de formación de los complejos mediante una variante linealizada del método de las variaciones continuas.

METODOLOGÍA

Formación del complejo BCc

Se realizó la síntesis del complejo BCc, mediante la metodología reportada [6]. Se prepararon disoluciones de concentraciones 0.1 M y 0.2 M de perclorato de zinc hexahidratado y bencidina respectivamente, utilizando metanol como disolvente. Se preparó una disolución acuosa de tiocianato de amonio de concentración de 0.1 M. Se mezclaron volúmenes de 10 ml de disolución de bencidina y de perclorato de zinc hexahidratado obteniendo una relación molar 2:1. Se añadieron 20 ml de disolución acuosa de tiocianato de amonio gota a gota, para obtener una relación molar 2:1.2. Se realizó la reacción en agitación constante durante 4 horas. Se realizó la filtración por gravedad del precipitado y se dejó secar varios días hasta que el sólido adquirió una coloración café, se lavó con tolueno, dejándose secar en un desecador con sílica gel.

Formación de los complejos BCc-metal

Se prepararon disoluciones madre del complejo BCc, de nitrato de plomo (II) y cloruro de estaño (II) de concentración 0.01 M utilizando de manera individual acetonitrilo y metanol como disolventes, (el nitrato de plomo (II) resultó ser insoluble en acetonitrilo, por lo que la disolución se preparó a partir de un estándar de plomo en ácido nítrico de 1000 mg/l). Se prepararon disoluciones de concentración 120 μM del complejo BCc, de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y de SnCl_2 en cada disolvente partiendo de las disoluciones madre de concentración 0.01 M para las mediciones de sus barridos de emisión.

Determinación de las longitudes de onda de máxima emisión y excitación.

Se realizaron barridos con la modalidad Pre-Scan, para cada una de las disoluciones del quimiosensor de concentración 120 μM a lo largo de la región del ultravioleta-visible, con la finalidad de conocer la longitud de onda de máxima emisión y de máxima excitación, donde se trabajaron cada una de las especies. Una vez conocidas las longitudes, utilizando dichos valores, se realizaron barridos para cada una de las mismas disoluciones en la modalidad de emisión.

Determinación de las constantes de formación.

Se realizaron mediciones de emisión a partir de las disoluciones de 120 μM de BCc y de los iones metálicos, se tomaron alícuotas de manera que se tuviera un volumen constante de 3 mL por medición y manteniendo constante la suma de la concentración de BCc y los iones, con una concentración total de 120 μM , variándose la fracción molar del ion metálico de 0.1 a 0.9, en intervalos de 0.05, como se indica en la Tabla 1. Se realizó una medición con una fracción total de BCc, para obtener la intensidad de emisión cuando no se encuentra presente el ion metálico.

Con las lecturas de intensidad de emisión obtenidas, se sustituyeron los valores en la expresión linealizada del método de Job para realizar el gráfico, obteniéndose cuatro gráficos de los cuales se despejaron los valores de la constante de formación en cada uno de los casos.

Análisis estadístico de las mediciones.

Con los resultados obtenidos en las mediciones fue necesaria la realización de al menos tres repeticiones de cada una de las realizadas en la determinación de las constantes. Para evaluar si

existía diferencia estadísticamente significativa entre las medias se realizó una prueba ANOVA para la comparación de los valores obtenidos y los ya reportados, como hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de acuerdo con la prueba ANOVA, se realizó una prueba de Tukey, para evaluar cual fue dicha diferencia.

RESULTADOS

De los barridos realizados en modalidad Pre-Scan en el espectrofotómetro de luminiscencia LS-PE, se obtuvieron las longitudes de onda de máxima emisión y excitación para el compuesto de coordinación BCc tanto en metanol como en acetonitrilo (Figura 2).

Tabla 1. Valores de las disoluciones para las mediciones del gráfico de Job linealizado

X_{BCc}	$X_{M^{2+}}$	$V_{BCc} \text{ } 120 \mu\text{M}$	$V_{M^{2+}} \text{ } 120 \mu\text{M}$	$[BCc]$	$[M^{2+}]$
1.00	0.00	3000 μl	0 μl	120 μM	0 μM
0.90	0.10	2700 μl	300 μl	108 μM	12 μM
0.85	0.15	2550 μl	450 μl	102 μM	18 μM
0.80	0.20	2400 μl	600 μl	96 μM	24 μM
0.75	0.25	2250 μl	750 μl	90 μM	30 μM
0.70	0.30	2100 μl	900 μl	84 μM	36 μM
0.65	0.35	1950 μl	1050 μl	78 μM	42 μM
0.60	0.40	1800 μl	1200 μl	72 μM	48 μM
0.55	0.45	1650 μl	1350 μl	66 μM	54 μM
0.50	0.50	1500 μl	1500 μl	60 μM	60 μM
0.45	0.55	1350 μl	1650 μl	54 μM	66 μM
0.40	0.60	1200 μl	1800 μl	48 μM	72 μM
0.35	0.65	1050 μl	1950 μl	42 μM	78 μM
0.30	0.70	900 μl	2100 μl	36 μM	84 μM
0.25	0.75	750 μl	2250 μl	30 μM	90 μM
0.20	0.80	600 μl	2400 μl	24 μM	96 μM
0.15	0.85	450 μl	2550 μl	18 μM	102 μM
0.10	0.90	300 μl	2700 μl	12 μM	108 μM

De los barridos realizados se determinó la longitud de onda de máxima excitación y de emisión, 324 y 396 nm respectivamente para el caso de BCc en metanol. Los valores para BCc en acetonitrilo son de 327 y 391 nm para la longitud de máxima excitación y emisión respectivamente. Estos valores son dependientes del disolvente, por lo que para cada par de combinaciones de BCc con ion metálico se trabajó bajo dichas longitudes de onda respectivas al medio. Para corroborar que estos datos no variaran con respecto al tiempo, fue repetido el barrido de la misma disolución cada día que se realizaron mediciones, coincidiendo en todos los casos.

Mediciones de emisión de los complejos

Con las mediciones de emisión realizadas por triplicado, se obtuvieron los espectros de emisión de BCc-Sn y BCc-Pb tanto en metanol como acetonitrilo. En el caso de los espectros de BCc-Sn en metanol (Figura 3) y acetonitrilo (Figura 4), se muestran únicamente los espectros desde la fracción molar 0.1 de metal hasta el punto máximo de emisión, ya que esta es la zona de interés para el análisis. Por otro lado, los espectros de BCc-Pb tanto en metanol (Figura 5) como en acetonitrilo (Figura 6) son mostrados todos los valores de fracción molar del metal, dado que el comportamiento observado es diferente al esperado.

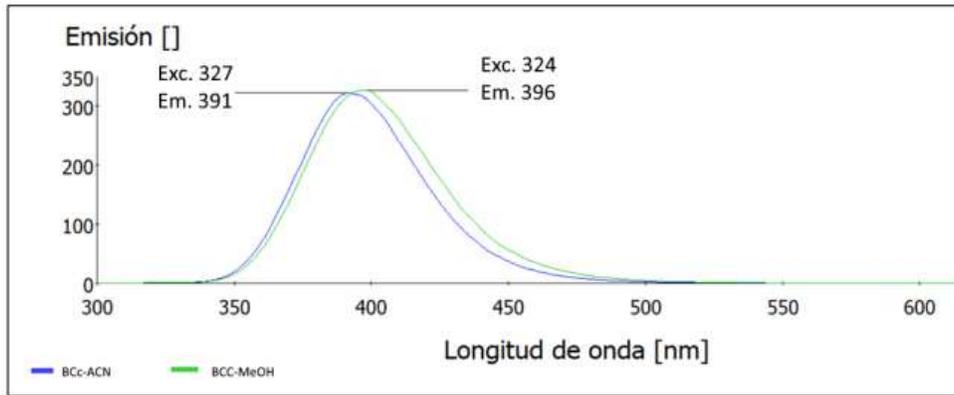


Figura 2. Barridos de emisión del BCC en metanol (verde) y acetonitrilo (azul)

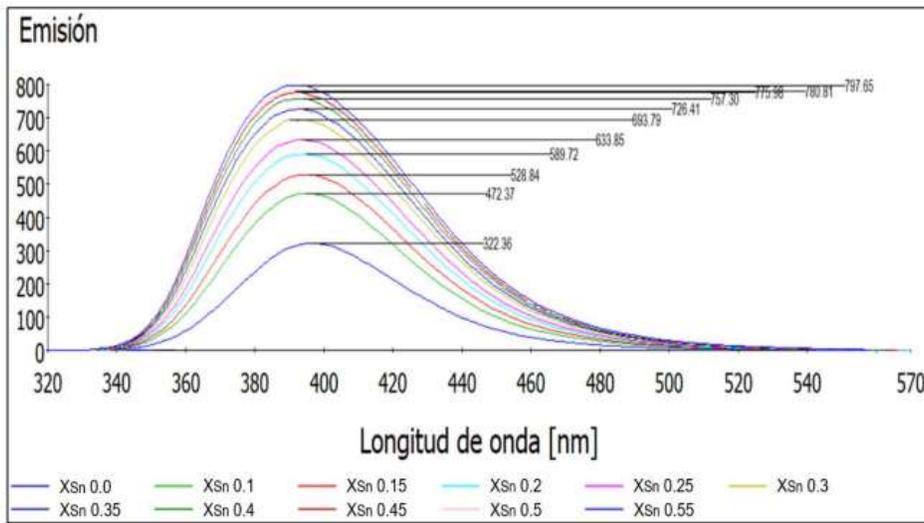


Figura 3. Espectros de emisión de BCC-Sn en metanol.

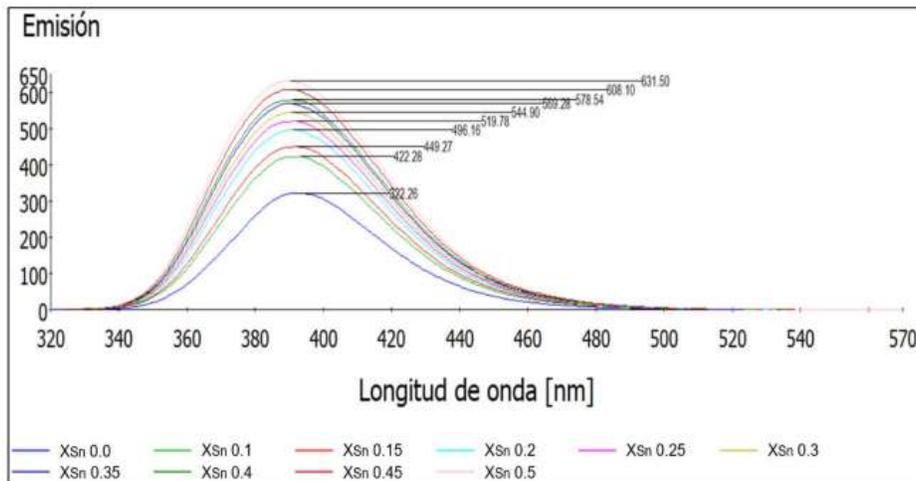


Figura 4. Espectros de emisión de BCC-Sn en acetonitrilo

Para ambos casos de BCc-Sn, los espectros obtenidos tuvieron un valor máximo en la fracción molar de 0.5 y 0.55, siendo este el comportamiento esperado, al indicar una estequiometría 1:1. En el caso de los espectros de BCc-Pb en metanol (Figura 5) y en acetonitrilo (Figura 6), se puede observar del lado izquierdo los valores de fracción creciente y del derecho los valores decrecientes. Para el caso del BCc-Pb en metanol, al momento de añadir más fracción del ion metálico, los valores de emisión no aumentaban de la manera esperada, pues se mantuvieron en un rango casi constante entre 320 y 350 unidades de emisión aproximadamente entre los intervalos de fracción molar de 0.1 a 0.55, por lo que se observa que el cambio en la emisión se mantuvo constante al no formar más complejo.

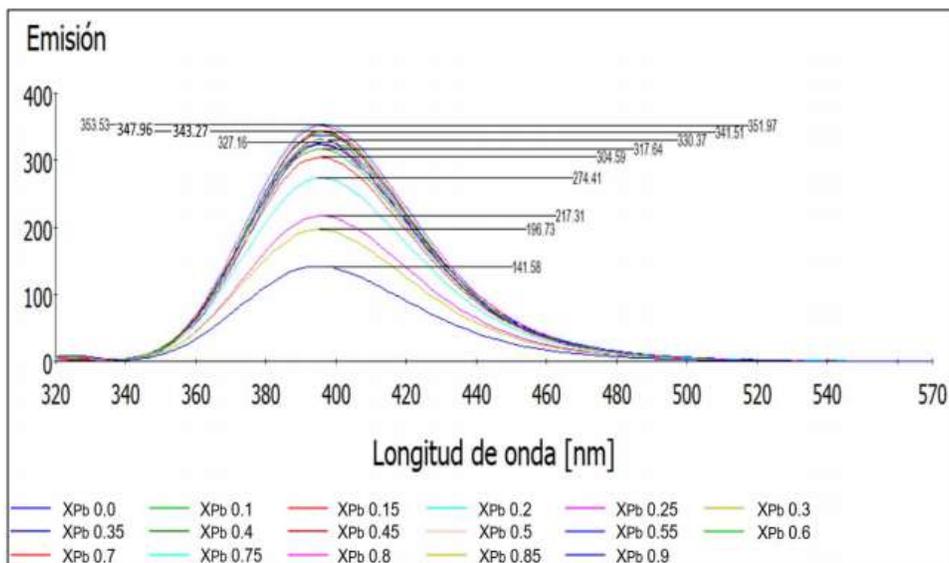


Figura 5. Espectros de emisión de BCc-Pb en metanol.

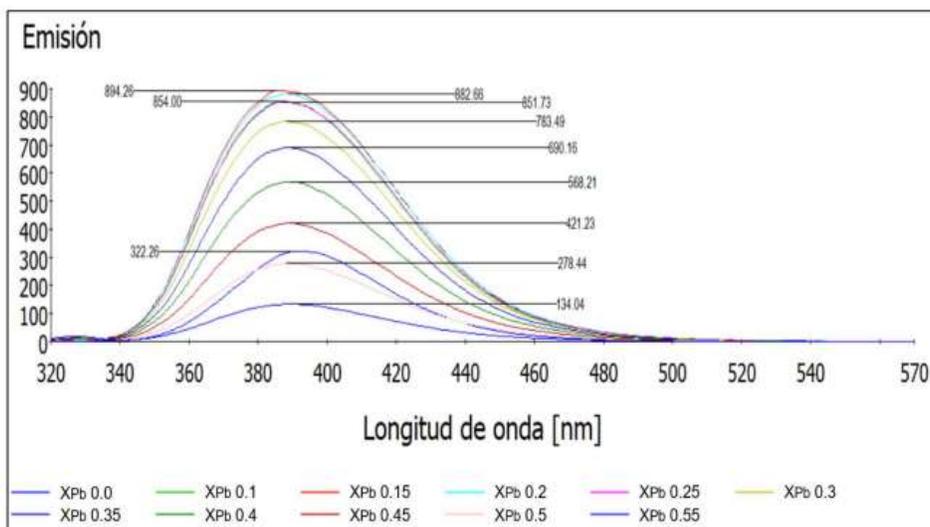


Figura 6. Espectros de emisión de BCc-Pb en acetonitrilo.

Pasando el punto máximo de emisión en fracción molar 0.2, comenzó la aparición de una segunda banda de emisión, lo que indica la presencia de una especie diferente a la estudiada, esto permite conocer que el complejo de interés es inestable y en metanol es más favorecida la formación de esta otra especie. En el caso de BCc-Pb en acetonitrilo, el punto máximo de emisión fue igual en la fracción molar de 0.2 y tras ese punto de igual manera que en el metanol, aparece una segunda

banda de emisión en la misma zona, indicando que en este medio también es más favorecida la formación de otra especie diferente a la de interés. A diferencia del metanol, la emisión disminuye conforme disminuye la concentración del quimiosensor, pudiendo ser esto producto del efecto del medio, al ser aprótico, cambia la forma en la que se hace el intercambio de electrones. De los espectros obtenidos se construyeron los gráficos de Job para la determinación de la estequiometría de la reacción de complejación entre el BCc y el ion metálico correspondiente, y el gráfico del modelo lineal de Hill, del cual se obtuvo la constante de formación condicional. Para el caso del BCc-Pb en metanol, al momento de añadir más fracción del ion metálico, los valores de emisión no aumentaban de la manera esperada, pues se mantuvieron en un rango casi constante entre 320 y 350 unidades de emisión aproximadamente entre los intervalos de fracción molar de 0.1 a 0.55, por lo que se observa que el cambio en la emisión se mantuvo constante al no formar más complejo.

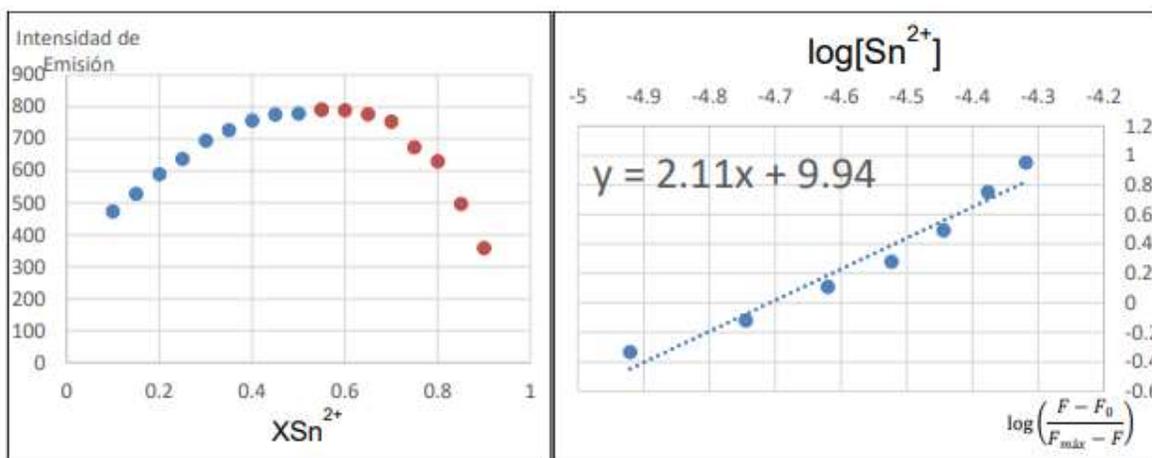


Figura 7. Gráficos de Job y de Hill para BCc-Sn en metanol.

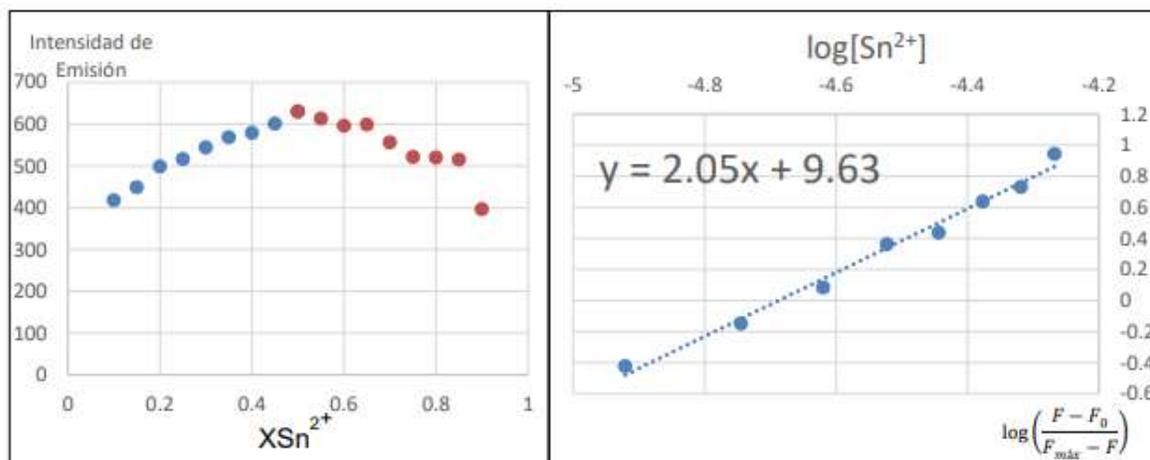


Figura 8. Gráficos de Job y de Hill para BCc-Sn en acetonitrilo.

Del gráfico de Job se determina una estequiometría 1:1, mientras que del gráfico de Hill, se promedian las ordenadas al origen de cada repetición para obtener un $\log K_f$ promedio, del cual se obtuvo la constante de formación condicional promedio. En el gráfico de Hill, la pendiente indica la cooperatividad de unión, un valor de 2, indica esta interacción entre dos iones, siendo el ion Zn (II) el que produce una facilidad para capturar el ion Sn (II). Para el caso de BCc-Pb, dado que las mediciones y la presencia de una segunda banda de emisión indican que el complejo de interés es inestable, la información que se obtendría de realizar los gráficos de Job y Hill no es útil, como es el

caso de la estequiometría, la cual sería de 4:1 observando únicamente los gráficos, lo cual no puede ser así, es por ello que no se reportan dichos gráficos.

En la Tabla 2, se indican los valores analíticos que se tienen de los complejos de BCc con Sn (II) y con Pb (II) en los medios analizados y los reportados previamente en un medio acuoso. En el caso de los complejos BCc-Sn tanto en metanol como en acetonitrilo, la estequiometría se mantiene 1:1, las constantes de formación condicionales obtenidas son mayores en magnitud con respecto a la de medio acuoso, lo que indica una mayor estabilidad de los complejos, y que se puede utilizar el quimiosensor para la detección del ion Sn (II) en los medios de estudio. Las longitudes de onda de máxima excitación y de emisión son diferentes por efecto del medio. En el caso de los complejos BCc-Pb, en comparación con los valores reportados en el medio acuoso, tanto la estequiometría como las constantes de formación condicionales no se pudieron determinar dada la inestabilidad de los complejos de interés, por lo que no hay comparación entre dichos parámetros, únicamente se puede decir que al cambiar de medio, el Pb (II) ya no es detectable por el quimiosensor. De las tres mediciones realizadas, se obtuvo el log K_f promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación, los cuales no están dentro de los valores para este tipo de estudios.

Tabla 2. Parámetros analíticos del BCc en diferentes medios

Complejo	Estequiometría	Constante de formación	λ de máxima excitación	λ de máxima emisión
BCc-Sn en medio acuoso	1:1	$6.16 \cdot 10^8$	280	410
BCc-Sn en metanol	1:1	$3.72 \cdot 10^{10}$	324	396
BCc-Sn en acetonitrilo	1:1	$1.23 \cdot 10^9$	327	391
BCc-Pb en medio acuoso	1:1	$7.55 \cdot 10^{10}$	280	410
BCc-Pb en metanol	No determinada	Complejo inestable	324	396
BCc-Pb en acetonitrilo	No determinada	Complejo inestable	327	391

Tabla 3. Estadística de los resultados

Complejo	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
BCc-Sn en metanol	9.94	11.17	10.59	10.57	0.6153	5.82%
BCc-Sn en acetonitrilo	9.19	9.63	8.44	9.09	0.6017	6.21%

Para evaluar si las constantes de formación condicionales obtenidas muestran una diferencia estadísticamente significativa, se realizó una prueba ANOVA con un intervalo de confianza del 95%, donde se obtuvo un p-value de 0.01, indicando que los promedios son diferentes estadísticamente, lo que se observa fácilmente en la Figura 9.

En la Figura 10 se comparan por pares los valores de las constantes de formación condicionales y se puede observar como todos indican diferencia estadísticamente significativa, siendo el más similar el par de H₂O-ACN, pero su valor de p ajustada indica que tienen un 74% de similitud.

Se evaluó cual es la diferencia mediante la prueba TUKEY HSD, de la cual se obtuvieron los valores de la Tabla 4 y la Figura 10.

Tabla 4. Resultados de la prueba TUKEY HSD

Grupo	Diferencia	P ajustada
H ₂ O-ACN	-0.0317	0.740
MeOH-ACN	0.1512	0.026
MeOH-H ₂ O	0.1830	0.011

La determinación de las constantes de formación condicionales mediante espectrofotometría de luminiscencia proporcionó la información respecto a la formación de los complejos en otros medios. En el caso del Sn (II) se sigue formando el complejo, incluso siendo más estable que en agua, pero se desconoce el límite de detección que tiene el ion en estos medios, el cual de no ser menor a los límites permisibles, no tendría uso el quimiosensor por más estable que sea el complejo. Para el Pb (II) se pudo observar que en estos medios propuestos, el complejo es inestable, y se favorece más la formación de otra especie presente en el sistema, lo que produce un descarte del quimiosensor para detectar este ion en los medios de estudio.

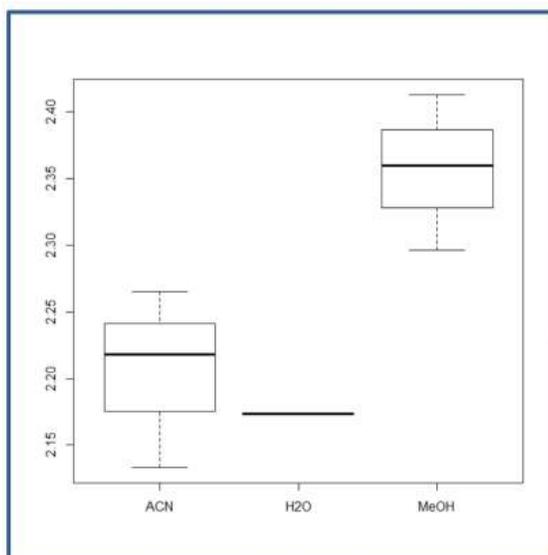


Figura 9. Diagrama de caja de la prueba ANOVA 95% de confianza.

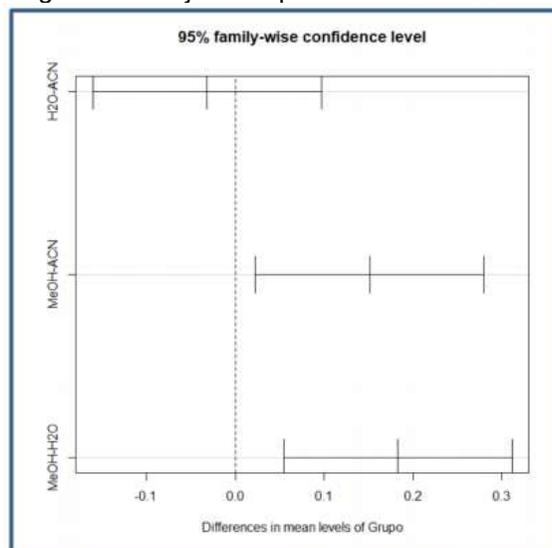


Figura 10. Diagrama de la prueba TUKEY HSD

CONCLUSIONES

El uso del quimiosensor para la detección del ion Sn (II) en acetonitrilo y en metanol es posible, pues las constantes de formación del complejo BCC-Sn en los medios estudiados son mucho mayores a 1, demostrando estabilidad en el complejo.

Los medios estudiados producen un efecto adverso a la formación del complejo BCc-Pb, en especial el acetonitrilo, consistiendo en la pérdida de la capacidad de formar complejos estables con el ion Pb (II).

El proyecto realizado puede complementarse en gran manera efectuando un estudio sobre la cantidad de complejo formado tras la reacción, lo cual se puede evaluar mediante la realización de una curva de calibración de los iones Sn (II) y Pb (II), de manera que, tras la medición de emisión, se mida la concentración restante del ion metálico, y así conocer cuánto reaccionó con el BCc para formar el complejo de interés. De igual manera ayudaría hacer una curva de calibración para conocer los límites de detección en estos medios. Otro complemento es la evaluación de la selectividad a los demás iones metálicos en los medios trabajados, pues se conoce que pierde la selectividad al Pb (II) dada la incapacidad de formar el complejo estable de interés, pero podría ser que se vuelva selectivo a otro ion metálico, lo cual sería interesante de conocer. Finalmente, el estudio del complejo formado en el sistema de BCc-Pb es algo de gran importancia, pues podría tratarse de un complejo con plomo en alguna otra forma diferente a la del mecanismo de detección presentado, y que de serlo, podría permitir que todavía se utilice el quimiosensor para la detección de plomo en esos medios, este estudio puede realizarse sobre todo en metanol, donde si bien la emisión no variaba realmente, si tuvo un incremento significativo desde la emisión inicial a la emisión tras 0.1 de fracción de metal, lo que indica que se forma algo del complejo de interés, y se mantiene a pesar de la adición de mayor cantidad y la aparición de la segunda especie. Con los valores obtenidos del proyecto realizado se pueden hacer nuevas investigaciones que impliquen el uso del quimiosensor BCc con los iones trabajados en los medios de estudio, ya sea reproduciendo el análisis para la determinación de constantes bajo otras condiciones de medio, pH o con otros iones.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. P. Carter, A. M Young & A. E. Palmer, (2014). "Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems". *Chemical Reviews*, 114(8), 4564–4601.
2. M. Chhatwal, A Kumar, V. Singh, R. D. Gupta & S. K. Awasthi, (2015). "Addressing of multiple-metal ions on a single platform". *Coordination Chemistry Reviews*, 292, 30–55.
3. L. Fielding, (2000). "Determination of Association Constants (K_a) from Solution NMR Data". *Tetrahedron*, 56(34), 6151–6170.
4. F. Firdaus, A. Farhi, M. Faraz, & M. Shakir. (2018). "Benzidine based fluorescent probe for the sensitive detection of heavy metal ions via chelation enhanced fluorescence mechanism—A multiplexed sensing platform". *Journal of Luminescence*, 199, 475–482.
5. W. Hummel, M. Filella, & D. Rowland. (2019). "Where to find equilibrium constants?" *Science of The Total Environment*, 692, 49–59.
6. S. Kundu, S. Roy, K. Bhar, R. Ghosh, C-H. Lin, J. Ribas, & B. K. Ghosh (2013). "Synthesis, molecular and crystalline architectures, and properties of a mononuclear complex [Coll(benzidine) 2(NCS)₂(OH₂)₂]" *Journal of Chemical Sciences*, 125(4), 723–730.
7. R. Morrison and R. Boyd, (1998). *Química Orgánica*. 5th ed. Boston: Pearson education, pp 225-229.
8. J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge, & D. B. Collum, (2013). *Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry*. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(46), 11998–12013.
9. H. Zhu, J. Fan, B. Wang, & X. Peng. (2015). "Fluorescent, MRI, and colorimetric chemical sensors for the first-row d-block metal ions". *Chemical Society Reviews*, 44(13), 4337–4366.

REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS MEDIANTE CARBÓN ACTIVADO UTILIZANDO EL RESIDUO AGRÍCOLA DE ESPÁRRAGO COMO PRECURSOR

Cathleen Daiana García Castañeda, Alejandra Maya Sánchez, Guillermo Andrade Espinosa

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico del Valle de Morelia.

cathleen61999@hotmail.com.

RESUMEN

El surgimiento de los plaguicidas nace en necesidad de proteger cultivos de malezas, insectos y enfermedades que puedan afectar una cosecha. Estos se clasifican en función de su empleo (insecticidas, fungicidas, herbicidas) o de su familia química (organoclorados, organofosforados, arsenicales, organometálicos, etc.). Michoacán ocupa el primer lugar en producción de diferentes cultivos, principalmente del aguacate y zarzamora a nivel mundial, en segundo lugar en producción de limón a nivel nacional y los 117 cultivos restantes, debido a esto, el estado lleva a cabo distintas actividades donde el uso desmedido de plaguicidas origina un gran problema de salud que afecta a personas de todas las edades y puede causar la muerte. Por lo que existe una extensa preocupación por la presencia de herbicidas organoclorados presentes en agua residual agrícola, ya que su empleo abusivo, que unido a un suelo previamente contaminado, deriva en filtraciones en aguas subterráneas provocando serias afectaciones a la flora, fauna y seres humanos que consumen estos agro-tóxicos en bajas concentraciones. Por lo tanto surge la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para remover estos compuestos organoclorados. En esta investigación se desarrollaron carbones activados con $ZnCl_2$ a diferentes concentraciones, cuyo precursor fue residuo agrícola de espárrago, para la eliminación de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) presente en agua. Los carbones activados fueron caracterizados determinando grupos funcionales, distribuciones de carga y microscopía electrónica de barrido. Finalmente, se determinó, en reactores en lote, la máxima capacidad de remoción de 2,4-DCP y cinéticas de adsorción a diferentes pH's. Los resultados muestran que los carbones activados tienen densidades de grupos funcionales oxigenados y básicos de hasta 1.70 y 2.98 mmol/g, respectivamente. La distribución de carga mostró que la carga superficial de los carbones es predominantemente negativa al disminuir el pH de la solución de 5 a 2. Además, se encontró que la capacidad de adsorción de 2,4-DCP mediante el carbón activado es altamente dependiente del pH de la solución, a medida que el pH aumenta de 5 a 9, la adsorción aumenta teniendo un máximo de 111.35 mg/g a concentraciones en el equilibrio de 100 mg/L. Finalmente, los experimentos de cinética mostraron que el 30% de la remoción total de 2,4-DCP se da en los primeros 5 min. Estos resultados indican que el residuo del espárrago analizado posee un gran potencial para ser precursor de carbón activado teniendo la facultad para remover contaminantes presentes en fase acuosa. Además, el aumento de este cultivo de espárrago en Michoacán produce una gran cantidad de residuo, esto deriva que sea de los mejores precursores para la realización de este carbón y poder proponer soluciones a la gran problemática de los herbicidas presentes en este estado y en todo el país.

Palabras clave: residuo agrícola, herbicidas, carbón activado.

INTRODUCCIÓN

El surgimiento de los plaguicidas nace en necesidad de proteger sus cultivos de malezas, insectos y enfermedades que puedan afectar una cosecha y estos se clasifican en función de su empleo (insecticidas, fungicidas, herbicidas) o de su familia química (organoclorados, organofosforados, arsenicales, organometálicos, etc.) [1]. Michoacán ocupa el primero lugar en producción de aguacate y zarzamora a nivel mundial, en segundo lugar en producción de limón a nivel nacional [2] y los 117 cultivos restantes y por ende la necesidad del uso desmedido de plaguicidas ocasionando un gran problema de salud que afecta a personas de todas las edades y puede causar la muerte, así como daños ambientales. Los principales afectados son Uruapan, Zamora, Los reyes, Zitácuaro, Apatzingán, entre otros. En los cuales se reportan 200 intoxicaciones agudas por mes [3]. Se estima que el 80% del agua que existe en Michoacán en ríos, lagos y presas, ya presentan algún grado de contaminación del tipo orgánica, y un 20% de este universo ostenta contaminación química que ya

es irreversible[4]. Esto se debe por consecuencia del transporte de los plaguicidas, estos al ser aplicados en el cultivo correspondiente, este se reparte en las fases sólida, líquida y gaseosa, en las cuales afectara de la misma forma, al ingresar a la fase líquida, este podrá ser transformado y transportado hacia el cuerpo de agua más cercano por medio de escorrentías, mediante la fase sólida los plaguicidas de igual forma pueden transportarse con el agua y afectar al suelo, ocasionando una erosión hídrica y por último en la fase gaseosa es incorporado a la atmosfera cuando se volatiliza desde el suelo o desde el agua que se encuentra en el suelo. De todas estas fases como ya se mencionó el impacto que tendrá en el ambiente, de igual forma afectara la salud de las personas.

Las malezas representan una gran problemática en la mayoría de los espacios cultivables causando pérdidas económicas totales. Como consecuencia teniendo competencia por luz y nutrientes en el cultivo, son hospedadoras de plagas y enfermedades, liberan compuestos tóxicos para evitar el crecimiento de otras plantas y ocasionan contaminación en ellas. Para el control de la maleza se utilizan los herbicidas [5], los cuales se encuentran dentro de la familia de los organoclorados uno de ellos el 2,4-diclorofenol el cual tiene efectos agudos en la salud al estar en contacto puede irritar y quemar la piel y ojos, al respirarlo irrita la nariz, garganta y los pulmones. En los efectos crónicos puede presentarse como riesgo de cáncer, para la reproducción y en efectos a largo plazo podría causar daño al hígado, riñón y afectaciones al sistema nervioso [6]. De acuerdo a datos registrados en la Secretaría de Salud de Michoacán (SSM), se tiene un informe donde refleja que el 90% de la población que habita en la franja aguacatera presenta problemas respiratorios, algunos manifiestan las alteraciones metabólicas con alergias [7]. A consecuencia de esta problemática y a necesidad de la población han surgido tecnologías para la remoción de estos contaminantes los cuales emplean los métodos de floculación, intercambio iónico, coagulación, membranas y de los más efectivos la adsorción el cual ha demostrado ser comprometedor en la eliminación de contaminantes en un medio acuoso[8] y para ello se necesita de materiales adsorbentes como son las resinas de intercambio iónico, zeolitas, arcillas, alúmina activada, biosorbentes y el más utilizado el carbón activado (CA) por su alta capacidad de adsorción de materia orgánica por lo que es considerado un adsorbente convencional, sin embargo, el alto costo de producción del carbón activado limita su aplicación en el tratamiento de aguas residuales. Es por ello, existe una creciente necesidad en la búsqueda de adsorbentes de bajo costo, preferentemente naturales y disponibles localmente [8], como es el residuo del esparrago que puede ser utilizado como precursor de CA además de ser una estrategia de control de contaminación, ya que es una fuente de biomasa. La superficie de siembra en México dedicada a esta hortaliza fue de poco más de 19 mil hectáreas de las cuales se estima que la generación de desechos es alrededor de 10 ton/ha [9]. En Michoacán el cultivo del esparrago ha tenido un crecimiento impresionante, a la fecha se tiene un poco más de 175 hectáreas cultivadas que arrojan una producción de casi 100 mil toneladas [10]. Por lo que en esta investigación se llevó a cabo la reutilización de un residuo lignoceluloso como precursor de carbón activado para posteriormente poner en contacto con un agente activante, el cual será capaz de remover el 2,4-DCF en su totalidad en solución acuosa.

TEORÍA

Objetivo: Producir carbón activado a partir de desechos de esparrago y su caracterización para la remoción de herbicidas organoclorados presentes en solución acuosa.

El 2,4-Diclorofenol (2,4-DCF) es un sólido cristalino e incoloro. Es usado para la fabricación de otras sustancias químicas y como intermediario en la fabricación de herbicidas, conservantes y desinfectantes. El 2,4-DCF es conocido como una sustancia peligrosa de acuerdo a la lista en la que figura como una de las Sustancias más Peligrosas (Hazardous Substance List) dado a que ha sido nombrado por el Department of Transportation (DOT), el New Jersey Department of Environmental Protection (DEP), la International Agency for Research on Cancer (IARC) [11], entre otras; Debido a que éste puede ser tóxico, corrosivo y peligroso para el medio ambiente durante su producción o cuando se aplican como pesticidas, haciendo mención, que una vez que éste ingresa al suelo, el plaguicida se reparte en las fases sólida, líquida y gaseosa, las cuales corresponden a:

- En la fase líquida está disponible para ser transformado o degradado química, física o microbiológicamente a otros compuestos; o transportado por el agua hacia lugares más hondos y eventualmente llegar al agua subterránea.
- Por su parte en la fase sólida, es retenido con diferente fuerza en lugares de enlace de la materia orgánica y arcillas del suelo. Resaltando que los plaguicidas pueden migrar por medio del agua cuyo proceso es mejor conocido como "Erosión hídrica" o transportados por el aire, proceso conocido como "erosión eólica".
- Y por último en la fase gaseosa, es incorporado a la atmósfera cuando se volatiliza desde el suelo o desde el agua que se encuentra en el suelo.

Por lo que en breve, la mayoría del 2,4-DCF liberado en el medio ambiente va a los cuerpos de agua, y en muy pocas cantidades al aire, lo que trae consigo afectaciones severas a la fauna acuática que se encuentren en dichos cuerpos de agua^[12]. Por lo que, los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas se han podido identificar en distintos tejidos y secreciones humanas. De tal manera que, el aumento en el uso de los pesticidas ha tenido como lugar una creciente preocupación sobre el efecto que dichas sustancias tienen sobre los ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres. Destacando que distintos informes de las Naciones Unidas han señalado que de todos los pesticidas usados en la agricultura, menos del 1% son incorporados a los cultivos. El restante termina contaminando la tierra, el aire y principalmente el agua^[13].

Todo lo anteriormente mencionado, es a consecuencia de la agricultura, la cual es al mismo tiempo causa y víctima de contaminación de los recursos hídricos, "causa" por la descarga de contaminantes y sedimentos en las aguas superficiales y/o subterráneas, por la pérdida neta del suelo como resultado de prácticas agrícolas desacertadas y por la salinización y anegamiento de las tierras de regadío, por otro lado es "víctima", por el uso de aguas residuales y aguas superficiales y subterráneas contaminadas, que contaminan a su vez los cultivos y transmiten enfermedades a los consumidores y trabajadores agrícolas, provocándoles riesgos a la salud que suscitan en efectos agudos sobre la salud (irritaciones o quemaduras de la piel y/u ojos, irritación de nariz, garganta y pulmones causando tos, respiración con silbido o falta de aire) o efectos crónicos sobre la salud (riesgo de cáncer, riesgo para la reproducción, o podría causar daño al hígado y al riñón), por lo cual Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU. (EPA) recomienda que la concentración de 2,4-DCF en el agua para beber no sean mayores que 0.02 ppm.

Poniendo en relieve, que el riesgo para la salud humana es inminente. De acuerdo a informes y datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2011, se calcula que en los países en vías de desarrollo aproximadamente del 20% de las muertes se deben directamente a causas medioambientales. Por ello es indispensable que los gobiernos y el hombre protejan los recursos renovables y no renovables y que tome conciencia que el saneamiento de los recursos tanto de suelos, aire e hídricos es elemental para la vida sobre el planeta^[14].

Isotermas de Adsorción

La afinidad del adsorbato por el adsorbente es cuantificada utilizando las isotermas de adsorción, las cuales son utilizadas para describir la cantidad de adsorbato que puede ser adsorbido sobre un adsorbente en el equilibrio y a una temperatura constante. Para la mayoría de las aplicaciones en el tratamiento de agua la cantidad de adsorbato adsorbido es generalmente una función de la concentración en la fase acuosa y a esta relación se le llama comúnmente isoterma.

Las isotermas de adsorción se llevan a cabo a colocando un volumen determinado con una cantidad conocida de adsorbato junto con varias dosis de adsorbente. La mezcla se mantiene a temperatura y agitación constante hasta que el equilibrio es alcanzado. Cuando esto sucede la concentración en la fase acuosa del adsorbato es medida y la capacidad de adsorción en el equilibrio para cada experimento se calcula utilizando el siguiente balance de masas:

$$q_e = (V/M)(C_0 - C_e)$$

donde:

q_e = Cantidad máxima de adsorbato removida por el adsorbente, mg adsorbato/ g de adsorbente

C_0 = Concentración inicial del adsorbato, mg/L

C_e = Concentración en el equilibrio del adsorbato, mg/L

V = Volumen de la fase acuosa, L M = masa del adsorbente, g

Para describir la capacidad de adsorción en el equilibrio de los adsorbentes se ha desarrollado varios modelos matemáticos. Entre los más comunes encontramos los de Langmuir y Freundlich.

A) Isoterma de Langmuir La isoterma de adsorción de Langmuir se utiliza para describir el equilibrio entre la superficie y la solución como un equilibrio químico reversible entre especies. La superficie del adsorbente está conformada por sitios activos donde las moléculas del adsorbato pueden ser químicamente enlazadas. Se propone que cada sitio debe de ser capaz de enlazar al menos una molécula de adsorbato; esto es, el modelo de Langmuir representa la acumulación de estas moléculas en una monocapa y la ecuación se expresa en términos de acumulación de masa del adsorbato sobre el adsorbente:

$$q_A = (Q_M b C_A) / (1 + b C_A)$$

Donde:

q_A = Cantidad máxima de adsorbato removida por el adsorbente, mg adsorbato/ g de adsorbente

C_A = Concentración en el equilibrio del adsorbato, mg/L

Q_M = Máxima concentración en la fase adsorbente de adsorbato, mg adsorbato/ g de adsorbente

b_A = Constante de adsorción de Langmuir, L/mg

B) Isoterma de Freundlich La isoterma de adsorción de Freundlich, originalmente fue propuesta como una ecuación empírica y se utiliza para describir los datos de adsorbentes heterogéneos tales como el carbón activado:

$$q_A = K A C_A^{1/n}$$

Donde:

q_A = Cantidad máxima de adsorbato removida por el adsorbente, mg adsorbato/ g de adsorbente

C_A = Concentración en el equilibrio del adsorbato, mg/L

K_A = Parámetro de Freundlich de la capacidad de adsorción, (mg/g)(L/mg)^{1/n}

$1/n$ = Parámetro de Freundlich de la intensidad de adsorción, sin unidades

La isoterma de Freundlich es consistente con la termodinámica de la adsorción heterogénea. La ecuación de Freundlich se puede obtener utilizando la ecuación de Langmuir para describir la adsorción sobre sitios de libre energía conocida y considerando las siguientes dos generalidades: i) La energía de los sitios de adsorción siguen una distribución de Boltzmann; y ii) El cambio en la entropía del sitio se incrementa linealmente con el incremento en la entalpía del sitio.

Existe una amplia gama de materiales adsorbentes que han sido utilizados en la remoción de contaminantes presentes en solución acuosa. Entre los más importantes encontramos al carbón activado, zeolitas, arcillas, alumina activada, polímeros sintéticos, quitina, quitosano y carbón de hueso. Cada uno de estos materiales cuentan con características únicas que pueden ser muy útiles en el proceso de tratamiento. En general los materiales adsorbentes pueden ser micro o meso porosos, tener una extensa área superficial interna (400 a 1500 m²/g), con un volumen de poro que va desde 0.1 a 0.8 mL/g y con grandes cantidades de sitios activos disponibles; esto da como resultado que estos materiales tengan grandes capacidades de adsorción dependiendo del tipo y concentración del adsorbato.

Cinética de adsorción

La eficiencia de un adsorbente depende de la capacidad de adsorción del adsorbato pero igualmente de la cinética de adsorción; es decir, de la velocidad con la cual el adsorbato es absorbido. El transporte del adsorbato desde el seno de la solución implica 3 etapas: i) el paso del adsorbato en el seno de la solución a la parte externa del adsorbente, ii) el paso por los poros del material, iii) la adsorción en el sitio específico. Para comprender como se lleva a cabo el proceso de cinética se ajustan modelos matemáticos de primer y segundo orden. Entre estos modelos se encuentran los siguientes: Modelo de isoterma de Elovich.

Este modelo se basa en un principio cinético asumiendo que los sitios de adsorción aumentan exponencialmente con la adsorción, lo que implica una adsorción multicapa. Se expresa por la relación: $\ln(q_e / C_e) = (\ln k E q_m) - (q_e / q_m)$

Donde:

kE es la constante de equilibrio de Elovich (L/mg)

q_m es la máxima capacidad de adsorción (mg/g)

Modelo de isoterma de Flory-Huggins

La isoterma original de Flory-Huggins describe el comportamiento de un enrejado bidimensional de partículas que no interactúan de diferentes tamaños.

$$q/Co = KFH(1-q)^{nFH}$$

Donde:

q_e/q_m es el grado de cobertura de la superficie

KFH es la constante del equilibrio de Flory-Huggins que se utiliza para el cálculo de la energía de Gibbs libre de espontaneidad.

nFH es el exponente del modelo

El modelo de isoterma de Flory-Huggins puede expresar la viabilidad y la naturaleza espontánea de un proceso de adsorción.

Ecuaciones que describen el orden de reacción El proceso de adsorción se describe generalmente con una ecuación cinética de pseudo-primero o pseudo-segundo orden. El orden de reacción está relacionado con el mecanismo de adsorción, que es el intercambio de iones o la precipitación superficial más frecuente.

Ecuación de Lagergren-pseudo primer orden La ecuación de pseudo primer orden supone que el catión contaminante se une solo a un sitio de sorción en la superficie del sorbente y está representada por la siguiente expresión:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t$$

Donde:

q_e (mg/g) y q_t (mg/g) representan la cantidad de adsorbato en el adsorbente en el equilibrio y a cualquier tiempo t , respectivamente.

k_1 (1/min) representa la constante de velocidad de biosorción.

Ecuación de Blanchard- pseudo segundo orden

La ecuación de pseudo segundo orden supone que los cationes del contaminante están unidos a dos sitios de unión en la superficie del sorbente. Se representa mediante la expresión matemática:

$$(t/q_t) = (1/k_2 q_e^2) + (t/q_e)$$

Donde:

k_2 (g/mg*min) es la constante de velocidad de biosorción.

q_e y q representan la cantidad de adsorbente removido (mg/g) en el equilibrio y a cualquier tiempo t .

La constante k_2 se usa para calcular la tasa de adsorción inicial, h (mg/g*min) mediante la ecuación:

$$h = K_2 q_e^2$$

El material que se empleará en ésta propuesta es el carbón activado; las generalidades sobre el carbón activado definen que es una forma tosca de grafito que presenta alto grado de porosidad y amplia área específica. Su química superficial depende del material precursor y el método de activación utilizado. Los grupos superficiales presentes en el carbón activado pueden ser de carácter ácido y básico. Los grupos que contienen oxígeno (carboxilo, carbonilo, lactona, hidroxilo, etc.) dan propiedades ácidas que permiten la adsorción de cationes; en tanto que, los grupos básicos que se asocian con estructuras tipo cromeno o estructuras tipo pirona pueden ser usados como sitios de adsorción de especies aniónicas. Este material está disponible en dos intervalos de tamaño de partícula; como carbón activado granular (CAG) con un tamaño de 0.5 a 3mm; y como carbón activado en polvo (CAP) con un tamaño de 20 a 50 μm ^[15].

La utilización indiscriminada de herbicidas están convirtiendo a nuestras zonas cultivadas en un auténtico desierto, provocando graves problemas de erosión, la pérdida de la fertilidad natural de la tierra, y la desaparición de los beneficiosos ecosistemas asociados a las zonas agrícolas[11]. Además de esto, al momento de aplicar estos herbicidas, gran parte de esto no son aprovechados para lo que se requiere y se desperdicia gran cantidad que llega a partes en las cuales no deberían llegar, como es a cuerpos de agua en los cuales se están presentando grandes afectaciones con el ecosistema y la toxicidad que estos llegan a tener con los animales que habitan, de igual forma con las personas que están en contacto con este cuerpo de agua, con exposición prolongadas, presentan problemas de salud. Debido a que los casos han ido en aumento sobre esta gran problemática, diversos investigadores de diferentes países, han comenzado a desarrollar tecnologías para remover

este tipo de contaminantes tan tóxicos y que no lleguen a perjudicar el ambiente y la salud de las personas, tal como son:

En Costa Rica un grupo de investigadores por medio de la nanotecnología, específicamente utilizando nanotubos de carbono se desarrolló una metodología de funcionalización utilizando nanotubos de carbono para la remoción de plaguicidas (bromacil) en agua de consumo humano. Para ello se utilizaron nanotubos de carbono funcionalizados con grupos OH-. Posteriormente se utilizaron buckypapers hechos a partir de nanotubos de carbono funcionalizados con grupos OH- sonificados en etanol (50 mg en 300 ml de etanol) y se concluye que son efectivos para la remoción de plaguicida (bromacil) en agua, logrando porcentajes de remoción de entre 83-92% a escala de laboratorio (volúmenes de 50-200 mL), sin embargo, es necesario en futuras investigaciones ampliar el número de pruebas a una escala piloto para mejorar su funcionamiento. (Bustos & Cerda, 2016)^[12] Así mismo en Brasil otro grupo de investigadores desarrollo otra alternativa de remoción de estos contaminantes debido a que los pesticidas están constituidos por moléculas biológicamente activas y de difícil remoción mediante el proceso convencional de tratamiento de agua, el uso de filtros lentos de arena seguidos por filtros de carbón activado puede representar un sistema eficiente en el tratamiento del agua. Considerando estos aspectos, el presente estudio tuvo como objetivos evaluar la eficiencia de la filtración lenta y la filtración utilizando carbón activado granular (CAG) en la remoción del herbicida atrazina en escala de laboratorio y determinar la composición fenotípica y genotípica de los microorganismos asociados a la degradación del herbicida. La eficiencia media en la remoción de atrazina fue del 97,3% y las concentraciones registradas en el efluente final durante el 97% del tiempo fueron menores a los 2 [micrón] g/L permitidos como valor máximo. (Zanini, Isique, y Minillo, 2014)^[13].

A su vez, una investigadora desarrollo un seguimiento de la remoción de plaguicidas en un reactor anaerobio/aerobio a través del uso de un biomarcador, los resultados obtenidos mostraron que el consorcio microbiano constituido por dieciséis cepas bacterianas de los géneros Bacillus, Corynebacterium, Pseudomonas, Aeromonas y Deinococcus es capaz de utilizar una mezcla de dimetoato y metomilo (plaguicida organofosforado y carbámico respectivamente) en concentración de 1 mg/mL en un reactor con sistema tipo batch. El porcentaje de remoción obtenido de la mezcla de dimetoato con metomilo fue de 70 % en un periodo de 120 horas; de las dieciséis cepas bacterianas únicamente siete se recuperaron de manera constante durante el monitoreo, sin embargo, es necesario mejorar las condiciones de eficiencia del reactor así como determinar si los metabolitos generados son menos tóxicos que las moléculas originales (Aguilar, 2013)^[14].

Asociando a este tipo de investigaciones, en Honduras se realizó una investigación en la cual se evaluó la degradación del herbicida 2,4-D, para esto se realizó empleando fotocatalisis heterogénea en un reactor de lámpara UVC a escala laboratorio. Además de evaluar la influencia de las variables de operación en el proceso de fotocatalisis en la eficacia de la remoción del herbicida 2,4-D y determinar el porcentaje de remoción. Se simulo el agua residual con concentraciones de 6, 18 y 24 mg/L del herbicida utilizando óxido de cinc como catalizador a concentraciones de 0.3, 0.6 y 1 g/L. donde se tomaron alícuotas de cada muestra cada 30 minutos para analizarlas en el espectrofotómetro para determinar que variable afectaba en la degradación. Obteniendo de este trabajo que la concentración de 6 mg/L es la mínima utilizada para degradar más rápido que las otras dos, con respecto a la cantidad de catalizador que se utilizó. Por otro lado se logró degradar un 49% con la concentración de 6 mg/L de 2,4-D y 0.6 g/L de ZnO como catalizador y 33% con concentración de 24 mg/L y 0.3 de ZnO en 3 horas (Ayala,2016)^[15].

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Se llevó a cabo la activación del carbón activado con el residuo del esparrago que es el precursor el cual se puso en contacto con una solución con el agente activante a relaciones molares a 1, 2.5 y 3.5 por 24 horas, posterior a ello se dejó secar en una estufa por 24 horas. Después se carbonizo en una mufla a una temperatura de 500°C.

Al tener nuestro material listo se caracterizó mediante titulaciones ácido-base para la determinación de sitios ácidos totales, básicos totales, carboxílicos, lactónicos y fenólicos, así como los puntos de carga cero (PCC) correspondiente a cada relación molar.

Después se realizaron distribuciones de carga para determinar el IR de cada muestra. Se realizaron experimentos de adsorción en reactores en lote, para posterior evaluar la capacidad de remoción mediante las pruebas de cinética que consistían en analizar el decaimiento de la concentración con respecto al tiempo.

RESULTADOS

Tabla. 1 Sitios funcionales.

Muestra (M)	SAT (mmol/g)	SBT (mmol/g)	SC (mmol/g)	SL (mmol/g)	SF (mmol/g)	PCC (pH)
1	1.56	2.55	0.7	0.13	0.72	5.77
2.5	1.70	2.98	0.91	0	0.79	5.66
3.5	1.63	2.86	0.47	0.11	1.0379	5.67

En los resultados de la **tabla 1**. Se muestran los sitios funcionales, en los cuales están las concentraciones de sitios ácidos, básicos, carboxílicos, latónicos y fenólicos, los cuales fueron determinados por titulaciones ácido-base con cada una de las R (g/g) de los carbones activados modificados. Los resultados muestran que los carbones activados tienen densidades de grupos funcionales oxigenados y básicos de hasta 1.70 y 2.98 mmol/g, respectivamente. Asimismo se obtuvo el PCC para cada R (g/g) (pH), en donde los valores de pH corresponden a los puntos de equilibrio de cargas sobre la superficie del carbón y por ende se puede alcanzar los rangos de pH óptimos para la mayor capacidad de adsorción de cada material.

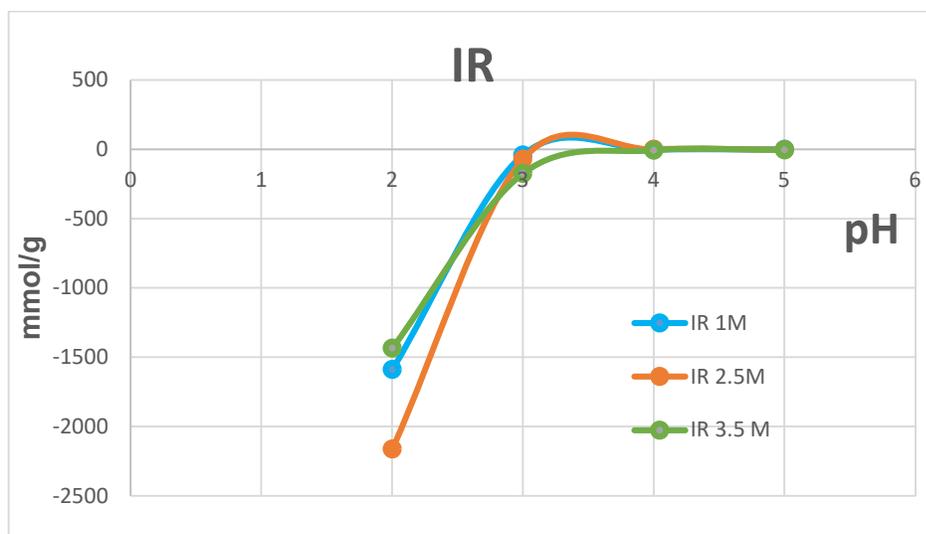


Fig. 1 Distribuciones de carga

En las distribuciones de carga (Fig. 1) se puede observar que en la parte donde intersectan los puntos son el rango en que se encuentra el PCC por lo cual se puede identificar a qué condiciones se tendrá una mayor capacidad de adsorción y por ello se alcanzara a establecer su condición propia favorable de cada material utilizado, por lo que se mostró que la carga superficial de los carbones es predominantemente negativa al disminuir el pH de la solución de 5 a 2

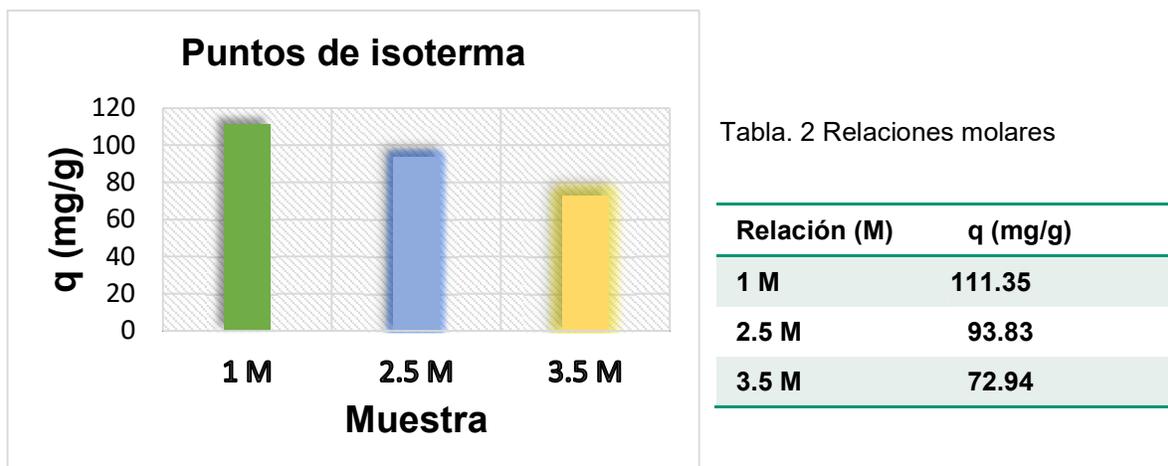


Fig. 2 Puntos de isoterma

En la Fig. 2 mediante las gráficas establecidas se muestra la capacidad de adsorción puntual de las 3 muestras, a concentración inicial de 1000ppm de 2,4-DCF, a una temperatura de 25°C y un pH de 7.

Posterior a ello, se realizó el análisis de los puntos de isoterma, al igual que los cálculos de la cantidad de concentración adsorbida con el carbón activado utilizado, para determinar los mg removidos por cada gramo de material utilizado, de los cuales se obtuvieron resultados satisfactorios, los carbones a relaciones de 1 M y a 2.5 M presentaron 111.35 mg/g y 93.83 mg/g como se observa en la tabla 2, es por ello que fueron los de más alta capacidad de adsorción en las concentraciones a 1000ppm de 2,4-DCF.

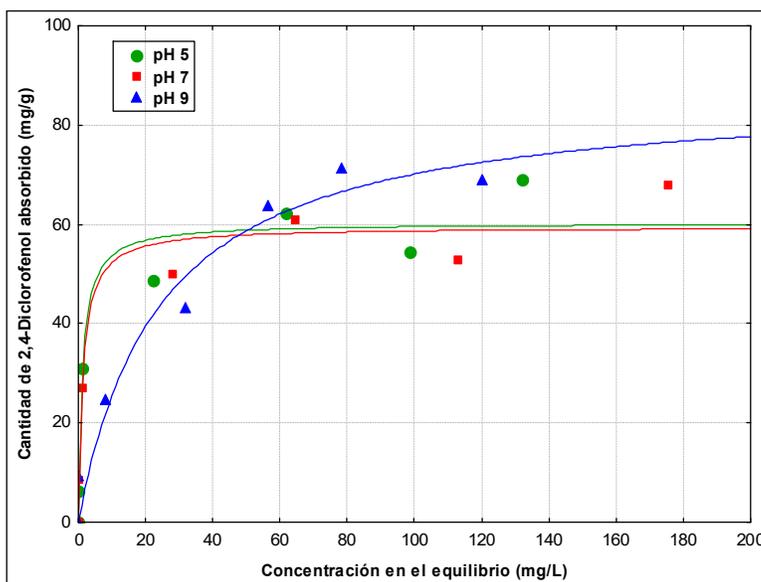


Fig. 3 Isothermas de adsorción de 2,4 Diclorofenol mediante carbón activado a pH de 5,7 y 9

Después de haber analizado los puntos de isoterma, se procedió a realizar las isothermas de adsorción con diferentes condiciones como se muestra en la fig. 3, para así, establecer la que mejor

se ajustaría de acuerdo a las cantidades de concentración inicial de 2,4-DCF. Se emplearon condiciones a pH de 5, 7 y 9 con una temperatura de 25°C y una concentración inicial de 1000ppm. Al término de esto, el resultado obtenido fue que a condiciones con un pH de 7, favorece la capacidad de adsorción del carbón activado, como se mencionó anteriormente, a una relación de 1 M posee la mayor capacidad de adsorción de 2,4-DCF.

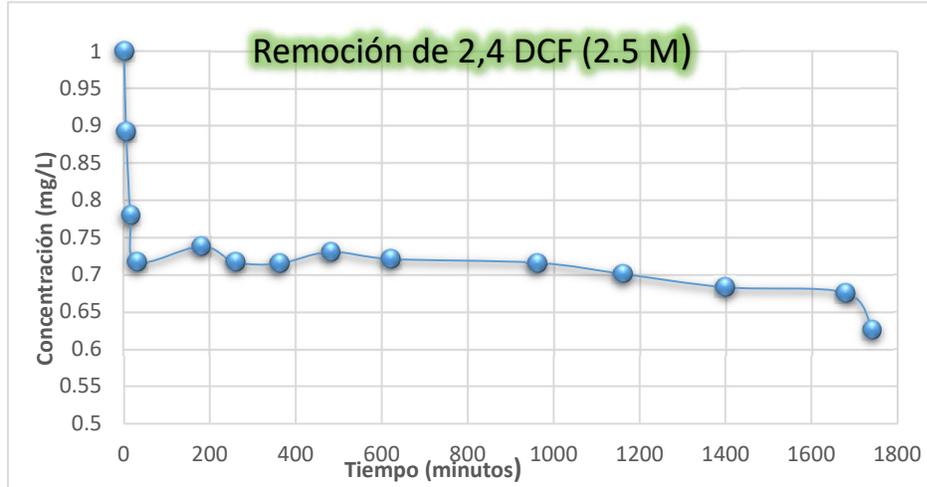


Fig. 4 Cinética. Decaimiento de concentración con respecto al tiempo (2.5M) de 2,4-DCF

En la Fig. 4 se presenta la cinética de remoción (2.5M) de 2,4-DCF por adsorción del carbón activado.

Al realizar las pruebas de cinética, se sometieron a un pH de 9 el carbón con una relación de 2.5 M ya que en las isotermas se demostró que a mayor pH mayor será su capacidad de adsorción, el decaimiento de la concentración bajó un 30% de la concentración inicial que fue de 1000 ppm esta se dio en los 5 minutos de estar en contacto el material con el 2,4-DCF y siguió bajando su concentración con una capacidad de 93.83 mg/g de material utilizado.

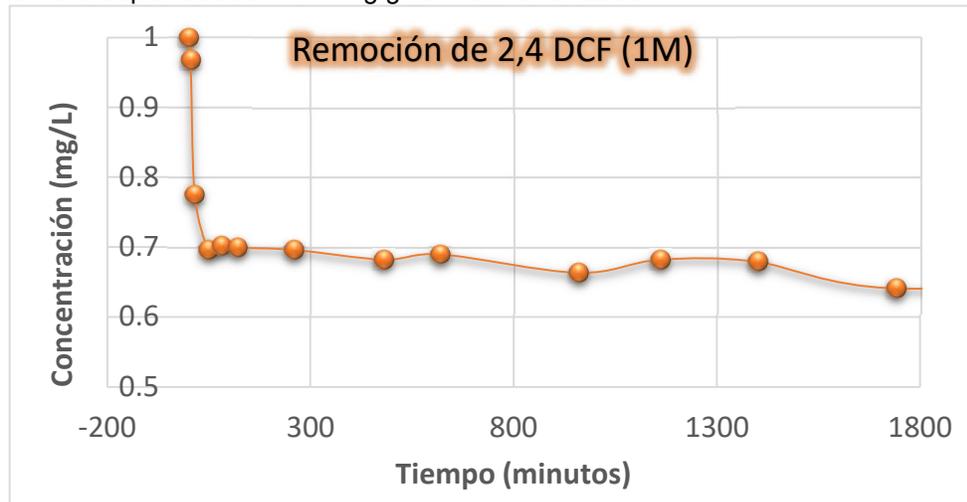


Fig. 5 Cinética de remoción (1M) de 2,4-DCF por adsorción del carbón activado.

Con el material a una relación de 1 M en la **fig. 5** se observó el mismo comportamiento de igual forma con una concentración inicial de 1000 ppm en donde la concentración bajó al 30% en los primeros 5 minutos, con una capacidad de adsorción de 111.35 mg/g, por lo cual se determinó que el carbón activado a esta concentración es el más eficiente.

CONCLUSIONES

En cuanto a lo abordado con anterioridad los resultados apuntan que el residuo del esparrago analizado posee un gran potencial para ser precursor de carbón activado, asimismo tiene la facultad para remover contaminantes presentes en fase acuosa, con una capacidad de adsorción de 111.35 mg/g en concentraciones iniciales de 1000 ppm. Además que en Michoacán con el aumento de este cultivo de esparrago y con la gran cantidad de residuo que se genera, hace que sea de los mejores precursores para la realización de este carbón y con ello solucionar la gran problemática con la contaminación de los herbicidas presentes en este estado y en todo el país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ramírez M. A., Montes B., Galván P. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia ergo sum* pp. 246-254.
2. Financiero. (2018). Michoacán, líder mundial de producción de aguacate y zarzamora. Recuperado de: <https://www.elfinanciero.com.mx/economia/michoacan-lider-mundial-de-produccion-de-aguacate-y-zarzamora>
3. MIMORELIA. (2017). Michoacán, de los estados con más intoxicación por plaguicidas. Recuperado de: <https://www.mimorelia.com/michoacan-de-los-estados-con-mas-intoxicacion-por-plaguicidas/>
4. Molina A. (2019). Omisión de federación respecto al uso de químicos afecta al medio ambiente del estado. Recuperado: <https://lavozdemichoacan.com.mx/morelia/se-estima-que-el-80-del-agua-en-michoacan-presenta-contaminacion-organica/>
5. INTAGRI. 2017. Los Riesgos de una Mala Aplicación de Herbicida. Serie Fito sanidad Núm. 93. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p.
6. <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/2344sp.pdf>
7. SMACCDT. (2019). Inadecuada aplicación de pesticidas en Michoacán esta generando daños en salud humana. Recuperado de: <http://semaccdet.michoacan.gob.mx/inadecuada-aplicacion-de-pesticidas-en-michoacan-esta-generando-danos-en-la-salud-humana/>
8. Cisneros M. G., Cárdenas C., Burelo P. (2016). Adsorbentes no-convencionales, alternativas sustentables para el tratamiento de aguas residuales. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rium/v16n31/1692-3324-rium-16-31-00055.pdf>
9. Fuente: SIAP-SAGARPA, www.siap.gov.mx/cierre_de_la_produccion_agricola_por_cultivo
10. SDRUA. (2018). Incrementa 440% la producción de esparrago en Michoacán: sdrua. Recuperado de: <http://sedrua.michoacan.gob.mx/incrementa-440-la-produccion-de-esparrago-en-michoacan-sedrua/>
11. ASTR. Resúmenes de Salud Pública: Clorofenoles (Chlorophenols). Recuperado de: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs107.html
12. Hoja informativa sobre sustancias peligrosas. Recuperado de: <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/2344sp.pdf>
13. Argeline V. (2015). Aplicación de enzimas vegetales para la remediación de compuestos fenólicos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.
14. Barrera G. (2005). El uso de herbicidas. Recuperado de: https://elpais.com/diario/2005/08/30/andalucia/1125354129_850215.html
15. Quirós-Bustos, N., & Valverde-Cerdas, J. (2016). Funcionalización de nanotubos de carbono para la remoción de plaguicidas en agua de consumo humano: el caso del Bromacil.
16. Zanini, J., Isique, W. D., Minillo, A., de Carvalho, S. L., Tangerino, E. P., Américo, J. H. P., & Ortiz, I. A. S. (2014). Remoción del herbicida atrazina utilizando la combinación de filtros lentos de arena y filtros con carbón activado granular. *Revista Técnica*, 37(2), 125-135.
17. FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L. P.; ELSNER, M. —Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*. 2013, 341, 752-758.
18. Castellan L. (2007). Contaminación por deriva con glifosato y 2,4 D en Loma Senés (Dpto. Pirané Provincia de Formosa, Argentina)

19. Aguilar Torrejón, J. A., & Meza Sánchez, J. C. (2013). SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN BIOMARCADOR.
20. Ayala Sol, B. (2016). Evaluación de la degradación del Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por Fotocatálisis Heterogénea.

PREPARACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO POR GELIFICACIÓN INVERSA PARA LA RECUPERACIÓN DE ORO (III)

Jessica Morales Aguilar, Liliana Hernández Perales, Esperanza García Vieyra, Ricardo Navarro Mendoza.

Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química.
Guanajuato, Gto. México
j.moralesaguilar@ugto.mx.

RESUMEN

El oro es un metal precioso de alto valor económico, con múltiples aplicaciones y una creciente demanda, por lo que el desarrollo de nuevas técnicas alternativas para su extracción está teniendo un gran auge,¹ tal es el caso del proceso de microencapsulación de extractantes, el cual presenta la posibilidad de extraer, separar y recuperar iones metálicos selectivamente, dependiendo del extractante que se utilice.² Recientemente, se ha desarrollado una generación de extractantes, los llamados líquidos iónicos (LI), los cuales, debido a su baja presión de vapor, han ido sustituyendo a los extractantes convencionales.³ En este trabajo se presentan los resultados del estudio de la recuperación de Au(III) a partir de soluciones de HCl 1 M, para lo cual se fabricaron diversos materiales encapsulados con alginato de calcio por gelificación inversa, empleando como extractante el LI Cyphos IL 101 (cloruro de trihexiltetradecilfosfonio). Para la preparación de las microcápsulas (MC) se elaboró primeramente una emulsión, la cual fue extruida mediante una técnica de goteo en una solución de alginato y después las MC se sometieron a un proceso de curado en una solución de CaCl₂. Se evaluaron diferentes parámetros, como la preparación de la emulsión, observando la estabilidad y la viscosidad de esta. También se estudió el tiempo de curado (1, 2, 3, 4 horas y 3 semanas), la resistencia mecánica, y finalmente se evaluó la eficiencia y velocidad de extracción del Au(III). Los resultados muestran una emulsión más estable a 3200 rpm. Las microcápsulas fabricadas con dicha emulsión se expusieron a diferentes tiempos de curado, observando que a partir de cuatro horas la morfología y la resistencia de las microcápsulas se ve considerablemente favorecida. Las cinéticas de extracción, en general, fueron lentas. El tiempo de curado no mostró un efecto importante sobre la velocidad de adsorción, pero sí sobre las propiedades mecánicas del material. Los porcentajes de extracción de Au(III) fueron altos (96%) para las microcápsulas con tres semanas de curado, mientras que para las microcápsulas 1 y 4 horas de curado su porcentaje de extracción fue del 85%. Los resultados obtenidos permitieron comprobar la eficiencia de extracción de Au(III) con el LI Cyphos IL 101 encapsulado con alginato de calcio por gelificación inversa, proponiendo esta técnica como una alternativa interesante para la recuperación de este metal.

INTRODUCCIÓN

El oro y otros metales preciosos tienen muchas aplicaciones en diversos campos tales como joyería, industria de monedas/medallas e industria electrónica donde proveen gran estabilidad química.⁴ Sus recursos son limitados tanto en términos de cantidades extraídas de fuentes primarias como de su distribución geográfica. La fuerte demanda, los altos precios y la rarefacción de estos metales han estimulado el reciclaje y la recuperación de estos recursos de fuentes secundarias, incluidos los materiales de desecho como, por ejemplo: catalizadores gastados, desechos de equipos eléctricos y electrónicos de las llamadas minas urbanas.⁵

Hoy en día, la encapsulación de extractantes resulta ser una técnica particularmente atractiva para la recuperación y/o concentración de metales a partir de soluciones diluidas obteniendo buenos rendimientos de extracción, todo esto dependiendo de las características de selectividad del extractante que se emplee. Debido a la toxicidad de los agentes de extracción convencionales, su alta volatilidad y costo, en este estudio se plantea utilizar el líquido iónico cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio (Cyphos IL 101) ya que los líquidos iónicos presentan algunas ventajas interesantes que los hacen únicos, tales como: alta estabilidad térmica, no son inflamables, tienen una presión de vapor casi nula, lo que evita la contaminación atmosférica y pérdidas por evaporación,⁶ así como que se han reportado estudios previos con este líquido iónico para la recuperación de iones

metálicos mediante extracción líquido-líquido,⁷ mostrando buena eficiencia de extracción, mediante la formación de clorocomplejos.

Generalmente, los extractantes encapsulados se obtienen en forma de microcápsulas (MC), cuyas características y propiedades dependen de los materiales utilizados y del método de encapsulamiento.⁸ En este trabajo, se prepararon MC por gelificación inversa, empleando como extractante el líquido iónico Cyphos IL 101 y alginato de calcio como encapsulante. Los materiales se prepararon a partir de una emulsión, la cual contenía, entre otras sustancias, el extractante (Cyphos IL 101) y CaCl_2 . Las microcápsulas se formaron por extracción de la emulsión en soluciones de alginato de sodio. El calcio se difunde del interior de las MC hacia su superficie, formando un gel de alginato de calcio en la superficie, el cual sirve como recubrimiento del extractante emulsionado. Finalmente, las MC se someten a un proceso de curado en una solución de CaCl_2 . En este estudio se prepararon varios lotes de MC utilizando diferentes condiciones de preparación de la emulsión y diferentes tiempos de curado, para estudiar el efecto de este parámetro sobre la morfología de las MC, su resistencia mecánica, estabilidad de la emulsión en el interior de las microcápsulas y la cinética de extracción del Au(III).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Para la síntesis de los materiales se utilizaron los siguientes compuestos: como extractante el líquido iónico Cyphos IL 101 (cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio), grado de pureza de $\geq 95.0\%$, tonalidad que va de incoloro a amarillo pálido, es ligeramente viscoso a temperatura ambiente, en la figura 1, se muestra la estructura química del extractante. Los reactivos como el CaCl_2 , sal de sodio de la carboximétil celulosa (CMC), alginato de sodio proveniente de las algas pardas Sigma- Aldrich (A2033-1KG) proveniente de algas pardas y el trihidrato de cloruro de oro (III) fueron marca Sigma-Aldrich, el ácido clorhídrico (HCl) fue marca Karal.

Todos los reactivos utilizados durante la parte experimental fueron grado analítico y se emplearon sin purificación previa. En todas las soluciones utilizadas se empleó agua desionizada como disolvente.

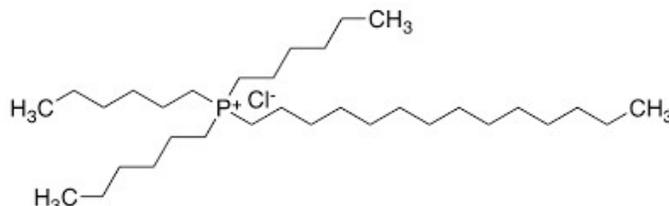


Figura 1. Estructura del cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio (Cyphos IL 101).

Determinación de la viscosidad relativa de las emulsiones.

Una vez fabricadas las emulsiones, se prosiguió a la determinación de la viscosidad relativa haciendo uso de una bureta de 10 mL, la cual contenía la emulsión, con ayuda de la Ecuación 1 usada en el viscosímetro de Ostwald la cual indica que la relación de los tiempos es igual a la relación de las viscosidades.

$$V_k = T_f * C_v \quad (1)$$

Donde:

V_k = Viscosidad cinemática

T_f = Tiempo de flujo entre dos puntos de referencia (de "x" a "y") en la bureta.

C_v = La constante del viscosímetro.

Con lo anterior se dedujo que la viscosidad relativa de las emulsiones está dada por la Ecuación 2.

$$\text{Viscosidad relativa} = \frac{V_i}{V_A} = \frac{T_{fi}}{T_{fA}} \quad (2)$$

Por lo que se tomó como referencia el tiempo de flujo más alto, siendo la viscosidad V_i la de cualquier muestra y V_A la de la emulsión que tardó más tiempo en pasar entre dos puntos de la bureta. T_{fi} es igual al tiempo de flujo de cualquier muestra y T_{fA} el tiempo de flujo de la emulsión que tardó más en pasar entre los puntos.

Procedimiento de encapsulación.

En la fabricación de las microcápsulas mediante gelificación inversa, se empleó como núcleo una mezcla de 5.6 g gr CMC 5.0 %, 1.2 gr CaCl_2 0.5 M y como extractante 3.0 gr de líquido iónico Cyphos IL 101 (condiciones identificadas en estudios previos), se evaluaron 3 emulsiones, cada emulsión se preparó en un tubo Falcón de 50 mL donde fueron homogenizadas de manera diferente, la emulsión A se homogenizó de manera manual durante tres minutos utilizando una pipeta de plástico, la emulsión B y C fueron homogeneizadas con un homogeneizador Ultraturraz T18 digital IKA a una velocidad de 3200 rpm durante tres minutos y 5000 rpm durante tres minutos, respectivamente. Una vez obtenida la emulsión esta fue extruida, mediante la técnica de goteo con una jeringa con un diámetro interno de 0.25 mm en una solución de alginato de sodio de viscosidad media al 0.5%, las microcápsulas permanecieron en agitación magnética durante tres minutos, posteriormente, las microcápsulas fueron retiradas del alginato y lavado con agua desionizada para retirar el exceso de este, transcurrido el tiempo las microcápsulas fueron dispersadas en una solución de CaCl_2 , 0.5 M para un curado, después fueron retiradas de la solución de curado y se colocaron en una solución de CaCl_2 , 0.1 M para su almacenaje. (ver Figura 2).



Figura 2. Proceso general de preparación de las microcápsulas

Una vez obtenido el material, se realizaron estudios de microscopía óptica utilizando un Microscopio estereoscópico: Zeiss, Stemi 508, para evaluar las características físicas, como forma y dimensiones.

Evaluación del tiempo de curado

La etapa de curado sirve para dar rigidez al recubrimiento del material, por tal motivo se evaluó si existía algún efecto del tiempo de curado en la capa de alginato. Con este propósito se preparó una emulsión homogeneizada utilizando el Ultraturraz a 3200 rpm durante tres minutos, y con ella se fabricaron microcápsulas utilizando diferentes tiempos de curado (1, 2, 3 y 4 horas) en una solución de CaCl_2 0.5 M.

Evaluación de la resistencia mecánica a la agitación

Para el estudio de la resistencia mecánica de los materiales fabricados, este se llevó a cabo colocando determinada cantidad de microcápsulas en viales de centelleo de vidrio las cuales se pusieron en contacto con dos soluciones, una solución de HCl 0.1 M y una solución de Au(III) a la misma concentración de ácido. Se dejaron en agitación tipo ping-pong a 150 rpm en una incubadora tipo orbital INO650-7 SEV durante tres días a una temperatura controlada de 20 ± 1 °C. Una vez transcurrido el tiempo, los materiales fueron retirados de las soluciones para su observación por microscopía óptica.

Estudio de extracción del Au(III)

Para este estudio se preparó una solución de Au(III) de aproximadamente 220 ppm en HCl 0.1 M para las microcápsulas de 1 y 4 horas de curado, mientras que para las microcápsulas con tres semanas de curado se utilizó una solución de 200 ppm de Au(III). Posteriormente, se pesó 0.2 g de microcápsulas y se pusieron en contacto con un volumen de 100 mL de solución de Au(III); la muestra se puso en agitación en una incubadora tipo orbital INO650-7 SEV a 150 rpm a una temperatura controlada de 20 ± 1 °C y durante tiempos establecidos se colectaron alícuotas de 0.2 mL y diluyendo la muestra con 1.3 mL de HCl 0.1 M. Finalmente, la concentración de Au(III) inicial y a diferentes tiempos se determinó con un Espectrofotómetro UV-Vis VARIAN Cary 50 Probe, usando una celda de cuarzo, un barrido de 400 a 200 nm y una longitud de onda de 314 nm.

Para determinar el coeficiente de difusión intraparticular se utilizó el modelo de Zhu y Sengupta⁹ Ecuación 4. Esta ecuación fue usada para determinar el coeficiente de difusión intraparticular (D), para el cual se obtuvo el mejor ajuste entre el modelo y los datos experimentales. Los valores de D se determinaron usando el Macro Solver de Microsoft Excel, minimizando el parámetro U (suma de cuadrado de las diferencias entre los valores experimentales y calculados para la fracción q_t/q_{eq}) probando diferentes valores de D. El parámetro U se calculó de la siguiente manera, Ecuación 3:

$$U = \sum \left(\left(\frac{q_t}{q_{eq}} \right)_{exp} - \left(\frac{q_t}{q_{eq}} \right)_{calc} \right)^2 \quad (3)$$

Donde $(q_t/q_{eq})_{exp}$ es el valor obtenido experimentalmente para la relación q_t/q_{eq} (fracción de aproximación al equilibrio) y $(q_t/q_{eq})_{cal}$ es la fracción calculada por medio de la Ecuación 4 para un determinado valor de D y un tiempo t.

$$\frac{q}{q_{eq}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \left[\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} e^{-n^2 \pi^2 D t / r^2} \right] \quad (4)$$

La aplicación del modelo de Zhu y Sengupta para el cálculo del coeficiente de difusión considera el radio de partículas esféricas (r), el cual representa la distancia máxima que recorre el adsorbato.

RESULTADOS

Determinación de la viscosidad relativa de las emulsiones.

Los resultados obtenidos para esta parte se pueden observar en la Figura 3a, la emulsión que tuvo un mayor tiempo de flujo fue la emulsión A, la cual fue homogenizada de forma manual, mientras que la emulsión C que fue homogenizada a mayores revoluciones en el Ultraturrax su tiempo de flujo fue el más bajo. Con estos resultados, se obtuvieron los valores de la viscosidad relativa mostrados a continuación.

En la Figura 3b se observa que en un inicio las tres emulsiones tienen gotas muy pequeñas de extractantes y rápidamente se van coalesciendo, de manera que se hacen gotas más grandes, observándose este fenómeno en las emulsiones A y C, mientras que la emulsión B a este tiempo aún se encuentra estable y sin una coalescencia significativa de las gotas de extractante, siendo importante durante el proceso de fabricación mantener el extractante relativamente disperso.

Por tanto, de acuerdo con los cambios significativos de viscosidad que existen dependiendo de la manera de homogenizar las emulsiones, esta llega a afectar en su estabilidad y puede afectar al momento de fabricar las microcápsulas.

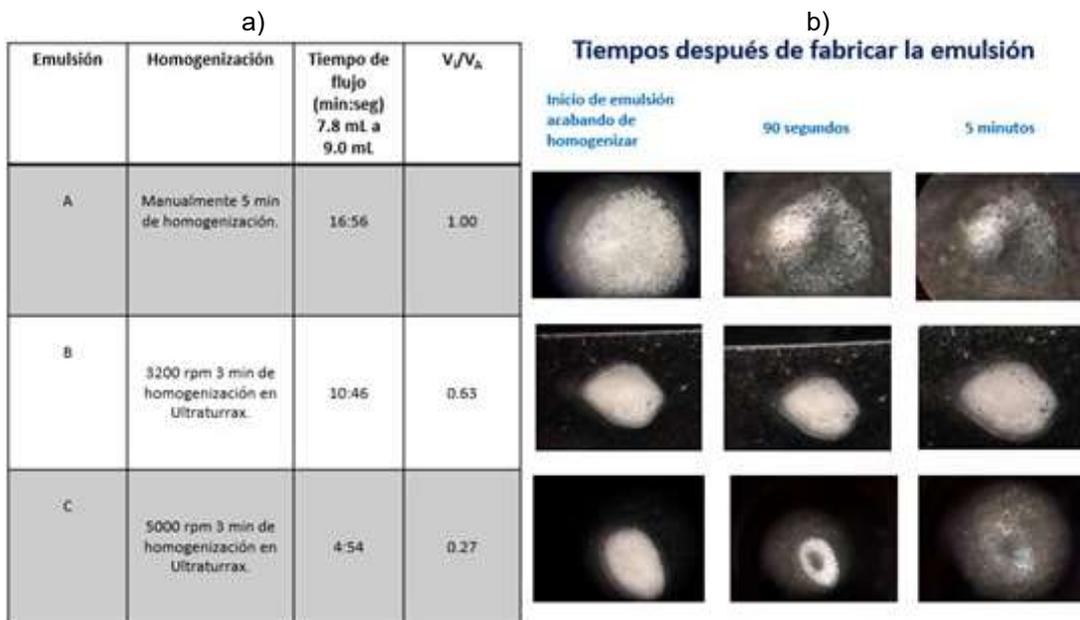


Figura 3. a) Tabla de viscosidades relativas, b) imágenes de emulsiones observadas en el microscopio a diferentes tiempos después de su homogenización.

Procedimiento de encapsulación.

Las imágenes microcápsulas obtenidas con ayuda del microscopio se observan en la Figura 4, una de las propiedades físicas que se busca en las microcápsulas es que tengan una morfología esférica, la cual fue obtenida a partir de la emulsión homogenizada a 3200 rpm Figura 4b, ya que las microcápsulas 4a y 4c que fueron fabricadas a partir de la emulsión homogenizada manualmente y a 5000 rpm respectivamente, se puede observar que ambas tienen una deformación significativa y no cumple con la propiedad física mencionada anteriormente.

Por lo que la preparación de la emulsión es importante ya que modifica la viscosidad y con esto condiciona la forma de las microcápsulas.

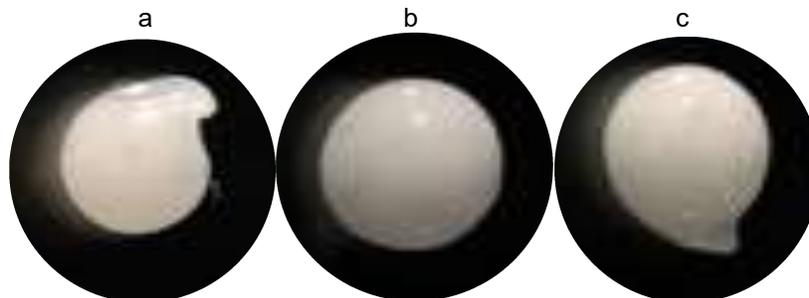


Figura 4. a) microcápsula con emulsión homogenizada manualmente, b) microcápsula con emulsión homogenizada a 3200 rpm c) microcápsula con emulsión homogenizada a 5000 rpm.

Evaluación del tiempo de curado

Después de determinar que las microcápsulas donde la emulsión fue homogenizada utilizando el Ultraturrax a 3200 rpm durante tres minutos, cumplían con la propiedad física la cual es que tengan una morfología esférica (Figura 4b), se sometieron a diferentes tiempos de curado (1, 2, 3 y 4 horas) en una solución de CaCl₂ 0.5 M. Posteriormente, fueron observadas en un microscopio (ver Figura 5). Este estudio se planteó para determinar cómo afectaría los tiempos de curado cortos, ya que el

curado sirve para dar rigidez al recubrimiento del material, por tal motivo se evaluó si existía algún efecto el tiempo de curado en la capa de alginato.



Figura 5. a) microcápsula con 1 h de curado, b) microcápsula con 2 h de curado, c) microcápsula con 3 h de curado y d) microcápsula con 4 h de curado.

Evaluación de la resistencia mecánica a la agitación

Los resultados obtenidos del estudio de resistencia mecánica se muestran en las figuras 6 y 7, donde los materiales evaluados fueron los fabricados con la emulsión homogenizada a 3200 rpm, una vez obtenidas las microcapsulas estas fueron evaluadas con 1 y 4 horas de curado en medio HCl 0.1 M y 200 ppm de Au(III) en HCl 0.1 M.

Las Figuras 6a y 7a muestran que las microcápsulas cuando se encuentran solamente en medio ácido conservan mucho su forma sin importar el tiempo de curado, pero cuando se ponen en contacto en medio de Au(III) HCl 0.1 M, la deformación es más significativa Figura 7b y esto es en función del tiempo de curado, dicha deformación puede deberse a que durante el proceso de formación de los complejos ($L^+AuCl_4^-$), las gotas del extractante con oro que están dispersas en el núcleo empiezan a coalescer formando gotas más grandes, causando la deformación de los materiales.



Figura 6. Microcápsulas con 1 hora de curado a) MC en medio HCl 0.1 M (2.43 mm) b) MC en medio Au(III) (2.12mm).



Figura 7. Microcápsulas con 4 horas de curado a) MC en medio HCl 0.1 M (2.43 mm) b) MC en medio Au(III) (2.39mm).

Estudio de extracción del Au(III)

En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos del estudio de la influencia del tiempo de curado sobre la velocidad de extracción del Au(III). El gráfico nos muestra como varía la fracción de la concentración residual (C_t/C_0) en función del tiempo de contacto. De manera general, son curvas descendentes que tienden a alcanzar una condición estable después de un largo tiempo. Las curvas correspondientes a 1 y 4 h de curado son idénticas y la de tres semanas está diferenciada porque se realizó a una concentración inicial más baja, su concentración residual es menor, pero el tiempo para alcanzar el equilibrio es el mismo que para los materiales con 1 y 4 h de curado. Cabe mencionar que los símbolos en el gráfico son los valores experimentalmente obtenidos, mientras que las líneas son representativas del modelo de Zhu y Sengupta, utilizando los valores de los coeficientes de difusión intraparticular calculados con dicho modelo (Tabla 2).

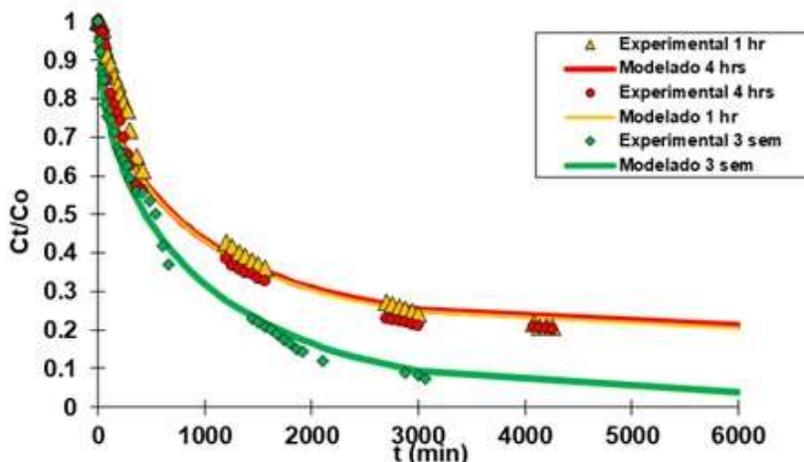


Figura 8. Modelo cinético de extracción de Au(III) mostrando la fracción residual de la concentración de metal en función del tiempo de contacto, utilizando MC fabricadas con diferentes tiempos de curado (1 h, 4 h y 3 semanas).

A continuación, se graficó la fracción de aproximación al equilibrio $q(t)/q_{(eq)}$, Figura 9, en el cual también se aplicó el modelo de Zhu y Sengupta⁹. Cabe recordar que este modelo nos permite conocer el coeficiente de difusión intraparticular que es un parámetro que ayuda a definir qué tan difícil o que tan fácil es la transferencia del soluto a través del sólido. Aunque la Figura 8 se ve ligeramente diferente a la Figura 9 por el hecho de tener concentraciones iniciales de Au(III) diferentes, pero una vez que las curvas son normalizadas aplicándoles el modelo de Zhu y Sengupta con respecto a la fracción de aproximación al equilibrio son coincidentes ambas figuras y los coeficientes de difusión intraparticular obtenidos son prácticamente idénticos Tabla 2.

Tabla 2. Coeficientes de difusión intraparticular de Au(III) en las microcápsulas con 1 h, 4 h, y 3 semanas de curado.

Microcápsulas	Coefficiente de difusión ($10^{-10} \text{ m}^2/\text{min}$)
MC 1 hora de curado	1.15
MC 2 horas de curado	1.12
MC 3 semanas de curado	1.12

De lo anterior, podemos concluir que el tiempo de curado mejora la resistencia mecánica, pero no afecta sensiblemente la difusión intraparticular, lo cual sugiere que la mayor resistencia a la difusión no se presenta en el gel que recubre las microcápsulas, si no en la parte interna de las mismas.

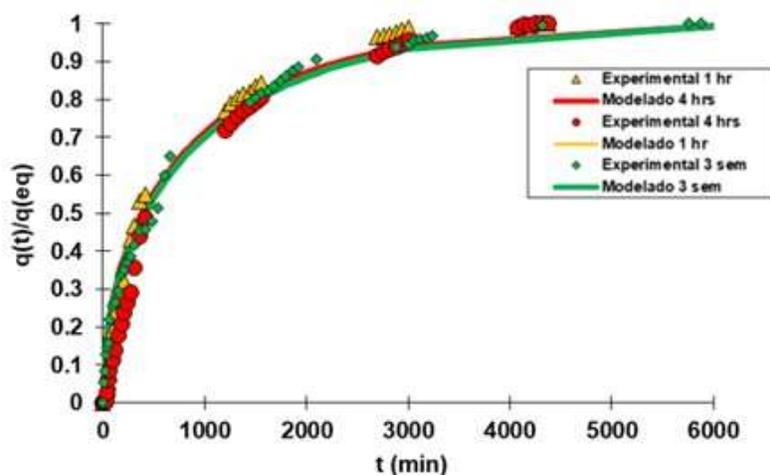


Figura 9. Modelo cinético de extracción de Au(III) mostrando la fracción de aproximación al equilibrio en función del tiempo de contacto, utilizando MC fabricadas con diferentes tiempos de curado (1 h, 4 h y 3 semanas).

CONCLUSIONES

Se logró la encapsulación del líquido iónico Cyphos IL-101 mediante gelificación inversa obteniendo 3 diferentes lotes de microcápsulas. La forma y la estabilidad de las MC depende de varios parámetros, como lo es la etapa de homogenización de la emulsión, siendo la más estable la fabricada a 3200 rpm. En lo referente a el tiempo de curado, se determinó que en 4 h se obtuvieron partículas muy esféricas, de tamaño homogéneo, con buenas propiedades mecánicas. La difusión intraparticular fue identificada como la etapa limitante de la velocidad de extracción del Au(III) y el modelo de Zhu y Sengupta se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales. En lo referente a los coeficientes de difusión intraparticular (D) obtenidos con el modelo de Zhu y Sengupta, estos no se ven afectados por el tiempo de curado.

Estos materiales pueden considerarse una alternativa prometedora a los sistemas convencionales para la recuperación de iones metálicos valiosos de soluciones de HCl. Como trabajo futuro se centrará la atención en la mejora de la estabilidad fisicoquímica de las MC y en la mejora de las propiedades de difusión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por el apoyo recibido, a través de la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (CIIC 2020, Proyecto 250/2020), gracias al cual fue posible realizar este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. Campos, T. Vincent, P. Bunio, A. Trochimczuk, E. Guibal, "Gold recovery from HCl solutions using Cyphos IL-101 (A quaternary phosphonium ionic liquid) immobilized in biopolymer capsules", *Solvent Extr. Ion Exch.*, Vol. 26, 5, 2008, pp.570-601.
2. S. Pandey, "Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts", *Analytica Chimica Acta.*, Vol. 556, 3, 2006, pp. 38-45.
3. R. Navarro, M. A. Lira, I. Saucedo, A. Alatorre, M. Avila, E. Guibal. "Amberlite XAD Resins Impregnated with Ionic Liquids for Au(III) Recovery"., *Macromolecular Symposia.*, Vol 374, 2017, pp.1-8.
4. M. A. Lira, R. Navarro, I. Saucedo, M. Martinez, E. Guibal. "Influence of the textural characteristics of the support on Au(III) sorption from HCl solutions using Cyphos IL101-impregnated Amberlite resins"., *Chemical Engineering Journal.*, Vol. 302, 2016, pp.426-436.

5. R. Navarro, I. Saucedo, M. A. Lira, E. Guibal. "Gold(III) Recovery From HCl Solutions using Amberlite XAD-7 Impregnated with an Ionic Liquid (Cyphos IL-101)". *Separation Science and Technology*, Vol.45, 2010, pp.1950-1962.
6. M. Regel-Rosocka, "Extractive removal of zinc(II) from chloride liquors with phosphonium ionic liquids/toluene mixtures as novel extractants". *Separation and Purification Technology*, Vol.66, 2009, pp.19-24.
7. A. Cieszyńska, M. Regel-Rosocka, M. Wiśniewski, "Extraction of Palladium(II) Ions from Chloride Solutions with Phosphonium Ionic Liquid Cyphos®IL101"., *Polish Journal of Chemical Technology*, Vol.9, 2007, pp.99-101.
8. D. Zhijian, M. Yong, H. Khizar, J. Chengsheng, X. Shuqin, Z. Xiaoming, "Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation"., *Journal of Food Engineering*, Vol.104, 2010, pp.455-460.
9. Y. Zhu, A. K. Sengupta. "Sorption enhancement of some hydrophilic organic solutes through polymeric ligand Exchange"., *Environmental Science and Technology*, Vol.26, 1992, pp.1990-1998.

PRODUCCIÓN DE GELATINASAS (PROTEASAS) POR BACTERIAS AEROTRANSPORTADAS

Linda Zafiro Yáñez Arellano¹, María Teresa Núñez Cardona², Cecilia Chula Quinto³, Raúl Venancio Díaz Godoy⁴

^{1,2,3}Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de El Hombre y su Ambiente Laboratorio de Ecología Microbiana., ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Departamento de Aceleradores
²mntnuez@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Algunas bacterias producen enzimas, extracelulares, que hidrolizan gelatina a través de un proceso conocido como gelatinolisis, estas son enzimas proteolíticas que son consideradas factores de patogenicidad en los microorganismos que las presentan¹. La gelatina está compuesta de polipéptidos de alto peso molecular, derivados del colágeno y sigue siendo material sensible al ataque de microorganismos en condiciones ambientales convenientes². El conocimiento de las enzimas extracelulares que los microorganismos producen, es una herramienta útil en las industrias farmacéutica y alimentaria, sin restarle importancia a que son factores de patogenicidad. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de producir gelatinasas en bacterias aerotransportadas. Se colectaron muestra de bioaerosoles, en dos puntos de Valle del Toluca: Ceboruco (26 de marzo de 2018) y Zinacantepec (16 de agosto de 2018), para ello, en el primero se colocaron filtros de fibra de vidrio en un equipo TC CORA (expuestos durante 24 horas), y en Zinacantepec se utilizó la técnica por impactación directa. Para obtener cultivos bacterianos a partir de los filtros, una fracción de este (1cm²) fue colocado, se dejó incubar durante 24 horas a 28°C; se hicieron diluciones hasta 10⁵. Se utilizó 0.1 de estas para inocular cajas de Petri con agar nutritivo, se hicieron estriados para contar con colonias separadas y realizar aislamientos; en el caso de la segunda técnica de colecta, se hicieron aislamientos de colonias al azar; en todos los casos los cultivos fueron incubados durante 24 horas, a 28 °C. Se aplicó la tinción de Gram para determinar la morfología celular y la pureza de los cultivos bacterianos. Para determinar la capacidad de los cultivos puros para producir gelatinasas, se hicieron crecer en caldo nutritivo y fueron incubados durante una hora a 28°C tras inocular un medio de cultivo preparado con 15.0 g/L de agar bacteriológico, 4.0 g/L de gelatina bacteriológica y 8.0 g/L de caldo nutritivo; los cultivos fueron inoculados durante 24 horas a 28°C. Para determinar la producción de gelatinasa se colocó alrededor del inóculo una solución de cloruro de mercurio (15 g de HgCl₂, 20.0 mL de ácido clorhídrico concentrado y 100 mL de agua destilada), que es un precipitante de la proteína. La presencia de un halo transparente alrededor del inóculo reveló la producción de gelatinasas. De los 16 cultivos puros aislados de Ceboruco dos fueron cocos Gram positivos y 14 cocobacilos Gram negativos, todos produjeron gelatinasa; De los 18 cultivos obtenidos de Zinacantepec, dos fueron cocos y 10 bacilos ambos Gram positivos, tres cocos y tres bacilos, ambos Gram negativos, de los cuales 11 produjeron gelatinasa (seis bacilos Gram positivos, tres bacilos Gram negativos y dos cocos Gram negativos). Como conclusión, no importa la morfología ni el Gram que presenten las bacterias aerotransportadas, esto no determina la producción de la enzima gelatinasa.

INTRODUCCIÓN

El aire que se respira en las principales ciudades del mundo, como México, están contaminadas tanto por procesos naturales como por las diversas actividades humanas. La exposición de las personas a los contaminantes atmosféricos está asociada con graves afecciones para la salud. Se ha observado que la exposición a contaminantes de manera continua aún en cantidades relativamente bajas, puede causar daños irreversibles a la salud³.

El aire, además de los compuestos atmosféricos, que varían de una zona a otra, al igual que los microorganismos presentes en esta, son capaces de crear estructuras especializadas que les permiten resistir y sobrevivir en las condiciones de la atmósfera, además de dispersarse en ambientes exteriores e interiores gracias a las corrientes de aire, las cuales se encargan de suspender a los microorganismos del suelo, el agua, las plantas así como a la microbiota proveniente

de los humanos y otros animales. Además, algunas actividades industriales, comerciales, sociales y de movilidad vial han contribuido a la producción de desechos biológicos, físicos y químicos, emitiendo material particulado que auxilian al camuflaje y transporte de los microorganismos para su dispersión⁴. Se han realizado investigaciones que han demostrado la presencia de microorganismos como bacterias y hongos en el que aire pueden causar patologías en plantas, animales y los humano, por lo que son responsables de enfermedades como asma, bronquitis, pulmonías, neumonías, que afectan especialmente las vías respiratorias e infecciones cutáneas⁴.

Algunas bacterias del aire, producen proteasas, que son enzimas (degradadoras) que catalizan las reacciones específicas y selectivas de las proteínas⁵, hidrolizando los enlaces peptídicos de las proteínas. Las proteínas naturales son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana, por ende, para que una célula pueda usar las proteínas, estas, primero, deben ser catabolizadas a componentes más pequeños. Estas enzimas capaces de producir gelatinólisis se demoninan gelatinasas. Son enzimas proteolíticas que a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos¹.

En los humanos, las enzimas proteolíticas intervienen desde la digestión de las proteínas de los alimentos hasta procesos como coagulación de la sangre por medio de la trombina, una serin proteasa. Así mismo, los leucocitos y los macrófagos en los sitios de infección, liberan colagenasas y gelatinasas en formas de proenzima, que pueden activarse mediante la escisión por proteasas bacterianas, aumentando así el nivel de daño local. Este es también el caso de algunas infecciones bacterianas de la superficie ocular, que pueden causar daños corneales graves y permanentes y, por lo tanto, afectar la visión⁶.

Por otro lado, las proteasas son utilizadas en diversos sectores industriales como el de la peletería, la producción de detergentes y alimentos (Ej. lácteos). De manera general, en los organismos vivos, son de gran utilidad para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas. Recientemente se han aislado bacterias proteolíticas provenientes de aguas residuales de hospitales para utilizarlas en las plantas de tratamientos de estos espacios, considerándolas como potencialmente útiles⁷.

En el presente estudio se colectaron muestras de aire en dos puntos de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (Ceburoco y Zinacantepec), zona de gran importancia económica, con gran desarrollo industrial, comercial y habitacional pero que demanda consumo de servicios ambientales y de energía lo que contribuyen al problema de la contaminación atmosférica³.

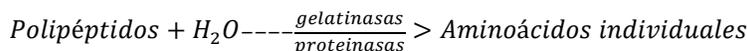
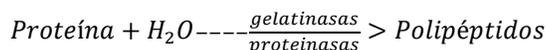
TEORÍA

Las proteasas pueden romper ya sea enlaces peptídicos específicos, dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína, o pueden reducir un péptido completo a aminoácidos. Debido a su gran diversidad de acción y a su estructura están subdivididas en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo del sitio de acción⁸.

Las peptidasas actúan sobre los enlaces peptídicos de los extremos de la cadena y pueden ser aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Las proteinasas actúan en el interior de la cadena y se clasifican de acuerdo con la identidad del residuo catalítico primario. Así pueden ser: serinproteinasas, cisteinil-proteinasas, aspartilproteinasas y metalo-proteinasas⁹.

La enzima estudiada en el presente trabajo pertenece a la Metaloproteinasas de la Matriz (MMP), estas cuentan con un átomo metálico como residuo catalítico primario, generalmente un átomo de Zn^{2+} . Las Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) tienen un peso molecular de 72 kDa en su forma latente para la enzima producida por los fibroblastos gingivales (gelatinasa A o tisular, [MMP-2]). La producida por los polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) tiene un peso molecular de 92 kDa (gelatinasa B o de neutrófilo, [MMP-9]).⁹ Su acción consiste en hidrolizar los productos de la ruptura del colágeno por las colagenasas, siempre que estén desnaturalizados; también presentan actividad colagenasa tipo IV. Además actúan sobre otras moléculas de la matriz del tejido conectivo asociadas con el colágeno⁹.

El catabolismo de las proteínas por parte de las gelatinasas es un proceso en dos pasos; el resultado final es una mezcla de aminoácidos aislados, como se ilustra en las reacciones siguientes.



La gelatina está compuesta de polipéptidos de alto peso molecular derivados del colágeno y sigue siendo material sensible al ataque por microorganismos en condiciones ambientales convenientes².

PARTE EXPERIMENTAL

El muestreo se realizó en dos puntos de Valle del Toluca: Ceboruco (26 de marzo de 2018) y Zinacantepec (16 de agosto de 2018), en el caso de Ceboruco, se colocaron filtros de fibra de vidrio en un equipo TC CORA (expuestos durante 24 horas), y en Zinacantepec se utilizó la técnica por impactación directa.

A partir de los filtros de fibra de vidrio, una fracción de este (1 cm²) fue colocado en 3.0 ml de caldo nutritivo, se dejó incubar durante 24 horas a 28°C y se hicieron diluciones hasta 10⁵. Se utilizó 0.1 mL de cada dilución para inocular cajas de Petri conteniendo agar nutritivo, se hicieron estriados para contar con colonias separadas y realizar aislamientos al azar. En el caso de las muestras colectas con la técnica por impactación directa, después de 24-48 horas de incubación, a partir de los cultivos con las colonias más separadas, se hicieron aislamiento al azar y e incubaron a 28°C durante 24-48 horas,

Para determinar las características morfológicas de las células bacterianas, se aplicó la tinción de Gram (en cultivos no mayores a 24 horas de edad). Se hicieron registros de su morfología y su respuesta a esta tinción, así mismo se determinó si los cultivos eran uniespecíficos (células con la misma forma y respuesta a la tinción de Gram).

Para determinar la capacidad de los cultivos bacterianos puros para producir gelatinasas, primero se hicieron crecer en caldo nutritivo (a 28°C durante una hora). Pasado este tiempo se inocularon cajas Petri conteniendo medio de cultivo para prueba de gelatinasa, el cual contiene lo siguiente: 15.0 g/L de agar bacteriológico, 4.0 g/L de gelatina bacteriológica y 8.0 g/L de caldo nutritivo. Los cultivos fueron incubados durante 24 horas a 28°C. Para detectar la producción de gelatinasa se colocó, alrededor del inóculo, una solución de cloruro de mercurio (II) que contiene: 15 g de HgCl₂, 20.0 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado y 100 mL de agua destilada. La presencia de un halo transparente alrededor del inóculo reveló la producción de gelatinasas.

RESULTADOS

Como se observa en la figura 1, los cultivos de Ceboruco (colectados con la técnica de fibra de vidrio), fueron cocos o cocobacilos, con respuesta positiva (2) y negativa, respectivamente, a la tinción de Gram, todos productores de gelatinasa. En tanto que en Zinacantepec (obtenidos por impactación directa) se observó una mayor diversidad morfológica bacteriana aisladas (Fig. 2), la mayoría son Bacilos Gram positivos.

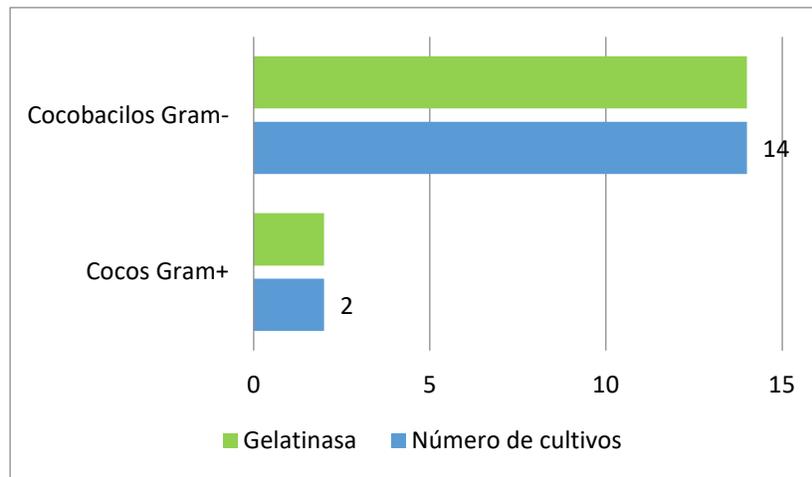


Figura 1. Morfología celular de los bacterianos puros y número de cultivos capaces de producir gelatinasa aislados de Ceboruco.

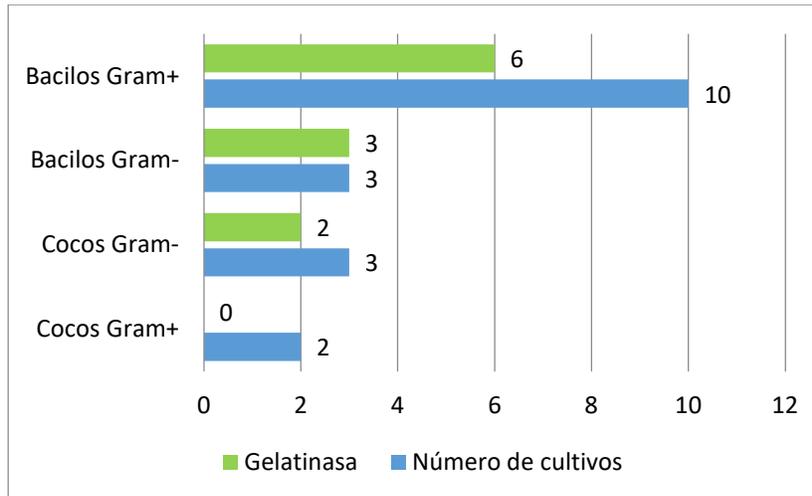


Figura 2. Morfología celular de los bacterianos puros aislados de Zinacantepec y número de cultivos capaces de producir gelatinasa.

En la figura 3 se presenta la morfología celular del total de cultivos productores de gelatinasa. Como puede observarse, los cocos Gram negativos fueron los que mostraron esta capacidad. Seguido de los bacilos Gram positivos.

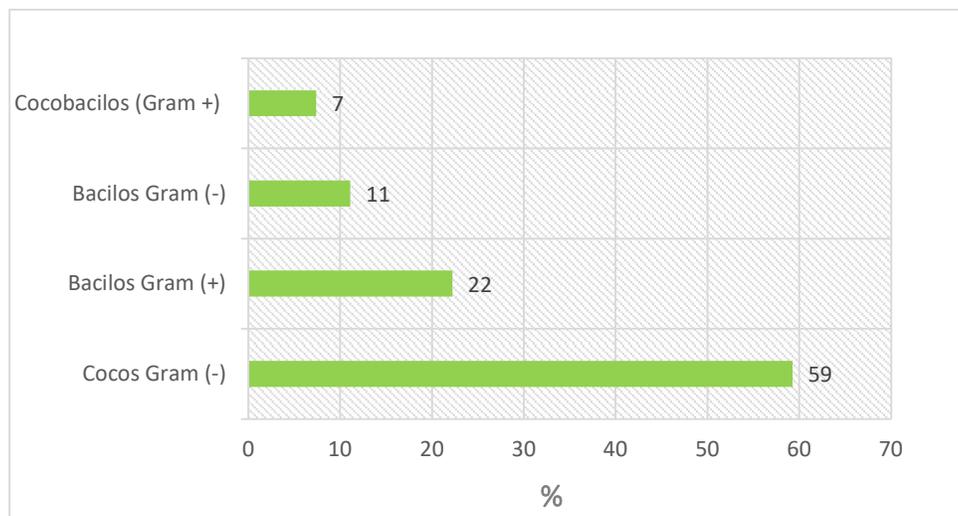


Figura 3. Morfología del total de bacterias productoras de gelatinasa aisladas de Ceboruco y Zinacantepec

La presencia de gelatinasas no solo es útil para la identificación de las bacterias, sino que es uno, de la gran diversidad de factores de virulencia que les son útiles para dañar a las células y causar enfermedad, no solo a los humanos sino a otros animales. Ejemplos de estos últimos son las que se han encontrado en el tracto respiratorio de aves corral (pollos y pavos), que incluyeron cinco especies de estafilococos (aisladas de animales), así como dos especies Gram negativas: *Flavobacterium* sp. y *Vibrio* (aisladas de suelo y agua), estas producen proteasas que potencializan la permanencia del virus de la gripe aviar¹⁰.

Dentro de los cocos Gram negativos, productores de gelatinasa están *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (producción de gelatinasa variable), ambas especies potencialmente patógenas para los humanos causandoles gonorrea y meningitis, respectivamente¹¹.

Por otro lado, bacilos Gram positivos como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* son organismos potencialmente productores de proteasas y favorecen el balance de la microflora en el tracto intestinal en animales de granja por lo que se utilizan como aditivo para alimentos de animales¹².

De manera general, las proteasas producidas por *Bacillus* spp. son de gran importancia debido a su estabilidad bajo condiciones ambientales diversas⁵.

Como se ha descrito previamente, del aire es posible obtener bacterias que pueden ser patógenas, pero también útiles en diferentes actividades productivas.

CONCLUSIONES

La producción de la gelatinasa, una enzima extracelular es producida por bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas e independientemente de su morfología celular, aunque el mayor número de bacterias productoras de esta enzimas fueron cocos Gram negativos, los cuales, en el ambiente provienen de los humanos y de otros animales. Se observaron diferencias en cuanto a la diversidad morfológica de las bacterias, en la estación Zinacantepec, se detectaron cuatro formas, mientras que en Ceboruco solamente cocos y cocobacilos.

Agradecimientos: al CONACyT por el financiamiento otorgado al proyecto número 34311922 y beca a Linda Zafiro Yáñez Arellano (29876)

BIBLIOGRAFÍA

1. J.F. Mac Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, No. 579.8, Médica Panamericana, 2003, pp. 161
2. C. Abrusci, et al, "Biodegradation of cinematographic gelatin emulsion by bacteria and filamentous fungi using indirect impedance technique", Int. BiodeteR. Biodegr, Vol. 60, 3, 2007, pp. 137-143.
3. M. Zuk, Tercer almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en nueve ciudades mexicanas, Instituto Nacional de Ecología, 2007, pp. 17
4. C. A Méndez, "Identificación de bacterias y hongos en el aire de Neiva, Colombia", Rev. Salud Pública Vol. 17, 2015, pp. 728-737.
5. M.A. Al-Allaf. "Isolation of Bacillus spp. from some sources and study of its proteolytic activity", Tikrit J. Pure Sci, Vol. 16, 4, 2011, pp. 59-63.
6. R. Blanco, "(-) Epigallocatechin-3-gallate inhibits gelatinase activity of some bacterial isolates from ocular infection, and limits their invasion through gelatine", Biochim. Biophys. Acta, 1620.1-3, 2003, pp. 273-281.
7. S. R. Dewi. et al. "Isolation of potential proteolytic bacteria from hospital wastewater", *J Phys. Conf. Ser*, Vol. 1402, 3, IOP Publishing, 2019.
8. J.A.J Zaragoza Carmon, "Aislamiento de cepas de bacillus sp. productoras de proteasas con potencial uso industrial", 2011.
9. B. E. García Triana, "Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria." Rev. Cuba. Estomatol, Vol. 35, 2, 1998, pp. 62-67.
10. B. R. Byrum, & R. D Slemons, "Detection of proteolytic bacteria in the upper respiratory tract flora of poultry", *Avian Dis.* 1995, pp. 622-626.
11. S. M. Hafis, "Gelatinase activity of Neisseria gonorrhoeae", *Microbiol. Lett*, Vol 2, 1, 1977, pp. 43-45.
12. Park, "Production of an extracellular protease by an Antarctic bacterial isolate (Bacillus sp. JSP1) as a potential feed additive", Rev Colomb Cienc Pecu, 2011, 24:3-10

EVALUACIÓN DE DOS PLANTAS AROMÁTICAS SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Yadira Quiñones Gutiérrez, María Porfiria Barrón González, Beatriz Licea Guajardo y Nestor Everardo Aranda Ledesma

Universidad Autónoma de Nuevo León

yadiragtz70@hotmail.com

RESUMEN

México es uno de los países que aún mantiene la cultura de la herbolaria para curar algunas afecciones de salud. Por lo que los investigadores usan estos antecedentes etnobotánicos de diferentes culturas para enriquecer el conocimiento en materia de medicinas naturales, con la ayuda de la tecnología y avances que la ciencia ofrece actualmente. Los hombres siempre buscamos una vida mejor y eliminar las enfermedades que nos rodean para mejorar la calidad de vida que podemos tener. Por eso, a lo largo de la historia ha sido muy recurrido el uso de herramientas que encontramos a nuestro alrededor para que nos ayuden en nuestro día a día. Y en estas herramientas, entran las plantas y hierbas medicinales que nos ayudan a curar algunas enfermedades que podemos padecer. *P. aeruginosa*, es una causa importante de infecciones en pacientes hospitalizados, pacientes con fibrosis quística y personas que han sufrido quemaduras. Dado que la aplicación de estos avances en la terapia médica, la mayoría de las condiciones que predisponen a las infecciones por *P. aeruginosa* han involucrado compromiso huésped y/o el uso de antibióticos de amplio espectro. Por otra parte, los extractos de *Pimpinella anisum* han mostrado actividad potente frente a bacterias patógenas y se sugiere considerar su uso como una alternativa para sustituir antibióticos. Mientas que en *Persea americana* var. Hass, diversos estudios reportan el contenido de más de 20 nutrientes esenciales, algunos de ellos relacionados con la inhibición de tumores cancerígenos. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad biológica de los extractos etanólicos de *P. anisum* y *Persea americana* var. Hass; utilizando como control negativo los antibióticos Polimixina B/Neomicina/Gramicidina de sobre el crecimiento in vitro de *P. aeruginosa* por el método de vertido en placa. Los bioensayos por medio de métodos de espectrofotometría y vertido en placa confirmaron la actividad bactericida del extracto etanólico de *P. Anisum* sobre *P.aeruginosa*, logrando la determinación de la dosis adecuada que muestra la capacidad inhibitoria. Podemos concluir en base a los resultados de este trabajo una nueva alternativa de terapia natural antimicrobiana, en sustitución a los antibióticos convencionales.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social, además de constituir un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención en las unidades donde se llegan a presentar. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad, e inciden en los años de vida potencialmente perdidos de la población que afectan, a lo cual se suma el incremento en los días de hospitalización y los costos de atención (Salud Publica de México, 1999) Las infecciones intrahospitalarias se presentan en un 5 a 10 % de pacientes que se internan en el hospital, el desarrollo de las mismas está en función a: la edad, siendo más frecuentes en los extremos de la vida, el estado inmunitario, ya que los inmunodeprimidos de diferente etiología son los más susceptibles y patología de base, la cual determina el destino de internación del paciente, de donde parte que, servicios de Unidad de Tratamiento Intermedio, quemados y salas quirúrgicas son las dependencias hospitalarias donde más frecuentemente se presentan las infecciones intrahospitalarias (Morales, 2001)

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo no fermentador, móvil y aerobio, aunque puede desarrollarse de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina. Es un microorganismo oportunista, de amplia distribución ambiental, presente en la tierra, materia orgánica en descomposición, vegetales y agua. Además se encuentra presente en recintos hospitalarios, principalmente en áreas húmedas como duchas, equipos de ventilación mecánica y equipos de limpieza, entre otros (Giske *et al.*, 2008)

Las infecciones invasoras por *P. aeruginosa* generalmente se producen en pacientes con enfermedades subyacentes: patología maligna, inmunodeficiencias, fibrosis quística, quemaduras y niños prematuros (OMS, 2003). Posee varios mecanismos de resistencia, tanto intrínsecos como adquiridos, que actúan independientemente o en conjunto, resultando en la expresión de resistencia frente a varias familias de antibacterianos como los β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas (Pier y Ramphai, 2010).

De acuerdo con Elliot (1999) la rapidez con que surgen los microorganismos multirresistentes no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos, por tanto, se concibe que pronto no drogamos eficientes para tratar a pacientes con sepsis graves. Por esta razón las plantas han constituido una parte esencial para tratar enfermedades desde la antigüedad ya que a diferencia de la medicina sintética o convencional, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, etc), y también productos de éstas, resultados de tratamientos directos con algún disolvente o medio que concentre los compuestos afines y facilite su administración, son los llamados extractos. En cualquier caso en esta matriz compleja nos encontramos con un sin número de compuestos de diferente naturaleza química, a esta mezcla se la llama fitocomplejo (Hoffmann A, 1992).

El fitocomplejo está constituido de sustancias activas denominadas técnicamente como metabolitos secundarios y se refieren a las sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis (Vivanco *et al.*, 2005). La mezcla de metabolitos secundarios son únicos para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Trease, 2006).

TEORÍA

Pseudomonas aeruginosa

La *Pseudomonas aeruginosa* (PA) es el principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae* y se identifica por ser un bacilo gramnegativo ligeramente curvado aeróbico (Mandell *et al.*, 2010) y que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista (Polack, 2002). Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C (Stover *et al.*, 2000). Presenta un típico color verdoso que se observa en muchas cepas el cual proviene de la producción de pigmentos fluorescentes como la pioverdina (pigmentos amarillo verdoso) o la piocianina (pigmentos azul verdoso hidrosoluble) y con menor frecuencia producen piorrubina (pigmento rojo) o piomelanina (marrón negrozco) (Ausina y Moreno, 2005). Produce un flagelo polar único aunque en algunas ocasiones se han aislado con dos o tres flagelos y muchas fimbrias o pili en la superficie celular y prácticamente todas las cepas presentan genes para la producción de un polisacárido extracelular (capsula exopolisacárida). Posee además una compleja membrana externa típica de las bacterias gramnegativas que contiene una gran selección de proteínas de membrana externa con funciones especiales para el crecimiento y el metabolismo celular (Fauci *et al.*, 2008).

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por su alto grado de adaptabilidad fisiológica y los elevados niveles de resistencia que manifiesta frente a numerosos agentes antimicrobianos (Nicas y Hancock, 1996). Constituye, por estas razones, uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes (Vilar, *et al.*, 2003) y es reconocida como un gran problema de salud al nivel mundial (Esnar y Diaz, 1997). *P. aeruginosa* puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca (Breidenstein *et al.*, 2011). Es capaz de permanecer por tiempos prolongados en líquidos y superficies como antisépticos, alimentos parenterales, equipos de inhaloterapia, fluidos de diálisis, grifos de agua, etc. También las colecciones artificiales de agua, como piscinas, depósitos, calentadores o baños de vapor, la albergan a menudo (Farrera, 1997).

Extractos vegetales

Las plantas han sido utilizadas durante siglos, por distintos grupos humanos, para tratar diversos padecimientos, ya que representan la principal fuente de productos naturales, entre ellos los “medicamentos”, que se utilizan por sus importantes efectos terapéuticos, tanto en el cuerpo humano como en el de otros animales (Mendoza y Figueroa, 2006). Las plantas medicinales según la Organización Mundial de La Salud (2007), se definen como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Ruiz y Susunaga (2000) definen un extracto vegetal como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados.

Persea americana var. Hass

El aguacatero es una especie originaria de México y Centro América y la única de importancia comercial, desde el punto de vista económico, de la familia *Lauraceae*, la cual comprende alrededor de 2 200 especies.

El fruto es una drupa, en forma de pera (Rodríguez y Sánchez, 2012) de tamaño medio (180 a 400 g.). Su largo medio es de 10 a 12 cm. y su ancho de 6 a 7 cm. La piel, ligeramente áspera, se separa con facilidad de la carne, variando su contenido de aceite entre 18 y 22 % (Rojas et al, 2004).

Según el tratado sobre plantas medicinales del Perú de Mostacero *et al.* (2011), el epispermo de la semilla de aguacate se toma en infusión acuosa por tres días para expulsar parásitos nematodos; así mismo reportan que la semilla se utiliza como tónico capilar en la caída del cabello, siendo también muy eficaz en enterocolitis diarreicas.

Gonzales *et al.* (2010) refieren que en años recientes los laboratorios cosméticos han empezado a interesarse en el aceite de aguacate por su elevado contenido insaponificable, por sus propiedades hidratantes, reestructurantes y antioxidantes y por su especial capacidad de aumentar la síntesis de colágeno.

Pimpinella anisum

Pimpinella anisum, popularmente conocido como anís, anís verde o matalahúva, es una planta aromática de la familia *Apiaceae* (Akhtar *et al.*, 2008). Es una planta anual con 30-50 cm de alto, flores pequeñas blancas y verde, de semillas amarillas, que crece en el oriente Región del Mediterráneo, Asia occidental, el Oriente Medio, México, Egipto y España (Salehi, 2010). *P. anisum* se cultiva principalmente por su fruto (anís) que cosechan en agosto y septiembre. Dicho fruto contiene 1,5-5% de aceite esencial (Zargari, 1996).

El fruto de *P. anisum* contiene 1.5-5% de aceite esencial y es utilizado como aromatizantes, mejorar la digestión, carminativo, y el alivio de espasmos gastrointestinales (Amin, 2005). El consumo de anís en mujeres en periodo de lactancia aumenta la leche y también relieves de sus bebés a partir de los problemas gastrointestinales (Aghili Khorasini, 2001)

Toxicidad

Desde tiempos muy antiguos las plantas han sido utilizadas como medicinas. Varias especies de plantas han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades parasitarias, por lo que, muchos grupos de investigación se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a estas afecciones. Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan (Roig, 1974).

Según Fresney (2000) los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas.

PARTE EXPERIMENTAL

Tamizaje fitoquímico

A cada extracto se le realizaron las pruebas de identificación química propuestas por Domínguez en 1973. El extracto obtenido en cada planta se sometió a la siguientes “pruebas coloridas” o pruebas de identificación química, cada una de estas pruebas fue llevada a cabo en placas de porcelana con varios pozos, cada pozo fue utilizado para una prueba en específico (Domínguez X. 1973)

Ensayo de MTT

El cultivo celular se mantuvo activo mediante resiembras, 2 días previos al ensayo toxicidad, agregando a placas de cultivo celular conteniendo 3 mL de medio DMEM %5 de antimicótico un inóculo de 100 μ L de cultivo celular e incubando a 37 °C a 5% de CO₂ durante 48 horas.

Una vez observado un tamizaje de células en la placa, se vació el medio y se agregaron 3 mL de Tripsina-EDTA y se incuban por 15 min para lograr la disgregación de las células, posteriormente se le agrego 3 mL de medio DMEM y se colocaron en un tubo cónico estéril de 15 mL. Se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se le agregan 3 mL de medio DMEM.

Posteriormente se tomaron 50 μ L de la suspensión celular y se colocaron en un tubo eppendorf conteniendo 50 μ L de azul trypan y se procedió a realizar el conteo de células vivas en cámara de Neubauer realizando los cálculos correspondientes para obtener 5×10^4 células por pocillo. Una vez ajustado el número de células se colocaron 100 μ L de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pozos y se incuban por 24 horas bajo las condiciones ya mencionadas para permitir su adherencia a la superficie de la placa.

Pasadas las 24 horas se retiró el medio de golpe y se colocan 100 μ L de cada uno de los tratamientos a concentraciones desde 1000 a 10 μ g/mL y se incubaron por 48 horas, se retiró el tratamiento y se realizaron dos lavados con DMEM; se agregaron 12 μ L de MTT y se incubaron durante 3 horas, finalmente se retira de golpe y se agregaron 100 μ L de DMSO a cada uno de los pocillos y se realizó la lectura de la placa a 570 nm.

Bioensayos

Método de espectrofotometría

Se tomó un inóculo inicial de 100 μ L de *P. aeruginosa* previamente activada y las concentraciones de cada uno de los extractos vegetales a evaluar [10, 50, 100 y 200 mg/mL], se mezclaron en tubos de 13x100 mm conteniendo un volumen de 3 mL de medio de cultivo Caldo Nutritivo estéril, los tubos se incubaron a 37°C por 24h, posteriormente se procedió a leer las absorbancias de los tubos a 635 nm en un espectrofotómetro, finalmente se realizaron los cálculos pertinentes a los valores obtenidos y se graficaron dichos resultados empleando el programa Microsoft Excel 2013.

Método de vertido en placa

En tubos de 13x150 mm contiendo un volumen de 9 mL de solución salina fisiología al 0.85%. Se agregó 1 mL de la mezcla de los tratamientos con extractos vegetales y *P. aeruginosa*, realizando diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-10} en placa de Petri por triplicado para cada uno de los tratamientos, posteriormente en condiciones de esterilidad, a las placas de Petri se vertieron 15 ml de Agar Nutritivo, homogenizando la muestra 8 veces la forma 8, dejando solidificar el agar a temperatura ambiente, ya solidificado el agar, las placas de Petri se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, después de este tiempo, se determinó la actividad biológica.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad por el modelo biológico de cultivo celular VERO se analizaron mediante el análisis estadístico con prueba de Tukey en SPSS.

RESULTADOS

Tamizaje fitoquímico

Detección de:	Prueba de:	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Persea americana var. Hass</i>
Insaturaciones	KMnO ₄	+	+
Grupo carbonilo	2-4-Dinitrodenilhidracina	+	+
Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	FeCl ₃	+	+
Esteroles y Triterpenos	Liebermann-Buchard	+	+
	Salkowski	+	+
Carbohidratos	Molish	+	-
	Cumarinas	+	-
	Lactonas	+	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	+	+
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Flavonas	Flavonas
Alcaloides	Dragendorff	+	+
Saponinas	Bicarbonato de Sodio	+	+
	Salkowski	-	-
Aromaticidad	Acido Sulfúrico-Formaldehido	+	-

Tabla 1. Resultados de las pruebas coloridas de los dos extractos vegetales

Actividad biológica de los extractos etanólicos de *Persea americana* var. Hass y *Pimpinella anisum* sobre *P. aeruginosa* por el método de espectrofotometría.

En la figura 1, se encuentran graficados los valores de absorbancia obtenidos por el método de espectrofotometría al emplear las concentraciones de 10, 50, 100 y 200 mg/mL de los extractos etanólicos de *P. americana* var. Hass y *P. anisum*. Además se empleó un control positivo de viabilidad celular, con un inóculo inicial de 100 μ L. y control negativo una mezcla de tres antibióticos Polimixina B/Neomicina/Gramicidina a concentraciones de 1, 3, 5 y 10 mg/mL. En este bioensayo se observa una sensibilidad de la cepa de *P. aeruginosa* al tratamiento de *P. anisum* a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/mL siendo la concentración de 200 mg/mL, la que presenta mayor actividad biológica. Por su parte el extracto etanólico de *P. americana* var. Hass, muestra un leve descenso en la absorbancia comparada con el control, mas sin embargo no es considerable en ninguna de sus concentraciones. Los resultados obtenidos en este bioensayo son el resultado de 3 eventos independientes por triplicado, graficando como medias con el programa Microsoft Excel 2013.

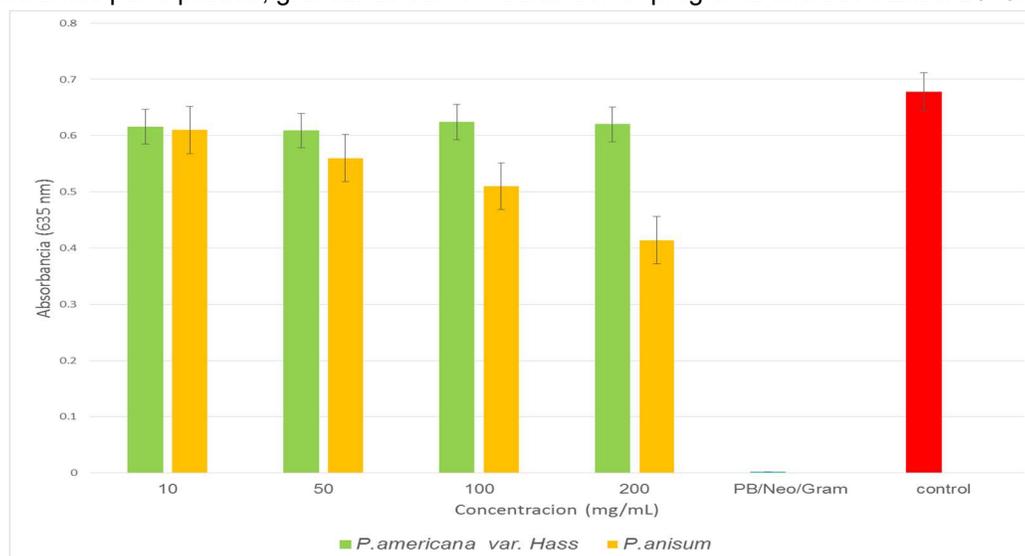


Figura 1. Determinación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de especies vegetales sobre *P. aeruginosa* por el método de espectrofotometría

Actividad biológica de los extractos etanólicos de *Persea americana* var. Hass y *Pimpinella anisum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* por el método vertido en placa

A continuación, de los datos obtenidos por el método de espectrofotometría, se procedió a determinar el número de células viables por el método de vertido en placa, graficando los resultados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

En la figura 2, se encuentran graficados los valores de UFC/ml obtenidos por el método vertido en placa al emplear todas las concentraciones que se evaluaron para los extractos *Persea americana* var. Hass y *Pimpinella anisum* sobre el crecimiento in vitro de *Pseudomonas aeruginosa*. Se empleó un control positivo de viabilidad celular con un inóculo inicial de 1 ml y un control negativo de crecimiento de una mezcla de tres antibióticos Polimixina B/Neomicina/Gramicidina en concentraciones de 1, 3, 5 y 7 mg/ml. Los resultados obtenidos para el control positivo muestran un valor promedio de rendimiento celular incontable. El extracto vegetal que presentó actividad biológica sobre el crecimiento in vitro de *Pseudomonas aeruginosa* fue el de *Pimpinella anisum* a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/ml con 872, 102,000, 922, 020,000 y 720, 420,000 UFC/ml respectivamente. Los resultados obtenidos en este bioensayo son el resultado de 3 eventos independientes por triplicado, graficando como medias con el programa Microsoft Excel 2013.

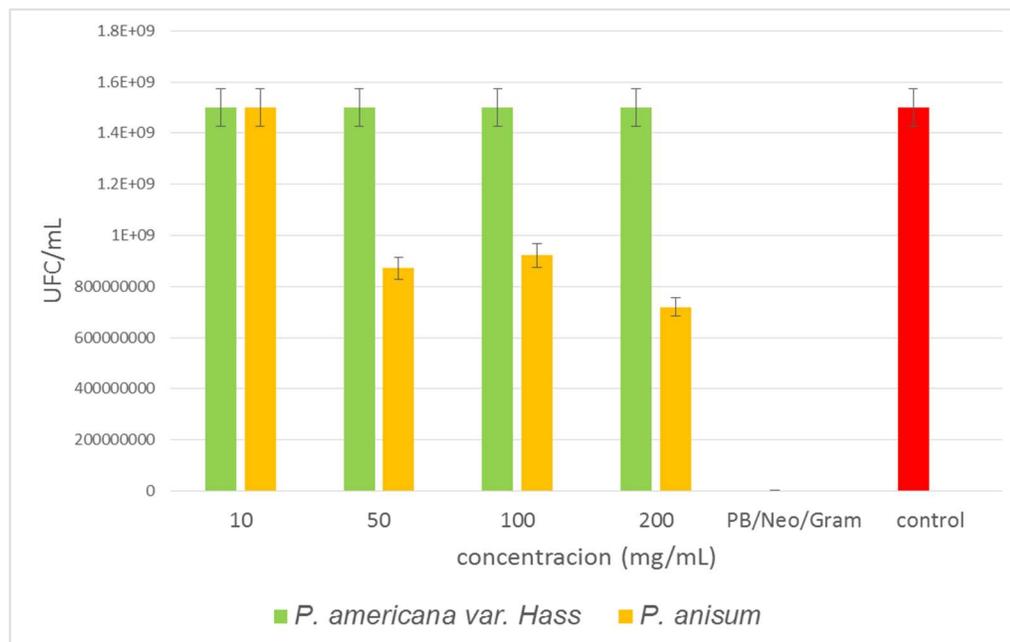


Figura 2. Determinación de la actividad biológica de los extractos vegetales sobre *P. aeruginosa* por el método de vertido en placa

Bioensayo de toxicidad sobre cultivo celular VERO por el ensayo de MTT.

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos en el ensayo a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 60, 30 y 10 µg/mL (A-G) organizados de manera descendente con cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos.

Estos resultados muestran una inhibición celular para el caso del extracto etanólico de *P. anisum* a concentraciones de 1000 y 500 µg/mL. Mientras que para *P. americana* var. Hass se observa inhibición a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL. El análisis estadístico en SPSS con prueba de Tukey reveló que a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL ambos extractos muestran toxicidad en células eucariotas estadísticamente hablando, sin embargo a 250 µg/mL se observa una mayor diferencia estadística en comparación al control.

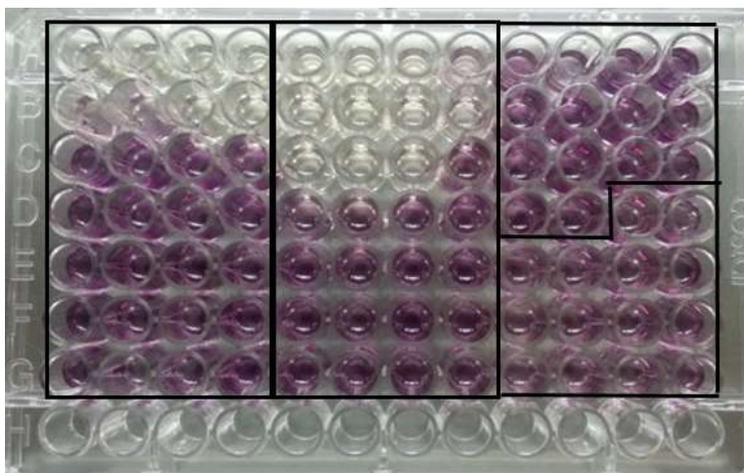


Figura 12. Ensayo MTT, *P. anisum*, *P. americana* var. Hass (de izquierda a derecha) Control + (superior der.) Control – (inferior der.)

Concentración (µg/mL)	N	Subconjunto		
		1	2	3
1000	8	.095000		
500	8	.135875		
250	8		.403000	
125	8		.428500	.428500
60	8		.536375	.536375
30	8		.537250	.537250
10	8		.567250	.567250
Control	8			.591750
Sig.		.997	.121	.125

Tabla 2. Análisis estadístico con prueba de Tukey

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Pimpinella anisum* presento actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* muestra resistencia a los antibióticos Polimixina B/Neomicina/Gramicidina a concentraciones de 1 y 3 mg/mL Tanto el extracto etanólico de Pimpinella anisum y Persea americana var. Hass muestran toxicidad sobre células eucariotas a concentraciones mayores de 250 µg/mL. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron establecer las bases para una posible formulación de tratamientos antibacterianos a partir de materia vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agenda de innovación Guerrero. Aguacate. Fundación produce de Guerrero. Disponible en:<http://fundacionproduceagro.org.mx/wpcontent/uploads/2013/09/Agenda+2012-2015.pdf> [Revisado el 02-10-16]
2. Aghili Khorasani MH, Makhzanal A, Bavardaran P. (2001). Research institute for Islamic and Complementary Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Akhtar A, Deshmukh AA, Bhonsle AV, *et al.* (2008). "In vitro Antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria," *Veterinary World*, vol. 1, no. 9, pp. 272–274.
4. Amin G, Zainal Abidin MA, Shahnazi S, Jamalifar H. (2005). "Antifungal activity of dried extracts of anise (*Pimpinella anisum* L.) and star anise (*Illicium verum* Hook, f.) against dermatophyte and saprophyte fungi," *Journal of Medicinal Plants*, vol. 8, no. 5; 24–29.
5. Ausina Ruiz V, Moreno Guillen S. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Buenos Aires; Madrid: Panamericana
6. Breidenstein EBM, De la Fuente-Núñez C, Hancock REW. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*; 19:419-426.
7. Elliot TS. (1999). Antibacterial resistance in the intensive care unit. *Mechanisms and management Br Med Bull*; 55(1):259-76.
8. Esnard SC, Díaz OE. (1997). Identificación y caracterización de bacilos Gramnegativos no fermentadores aislados en el medio hospitalario. *Rev Cubana Higiene Epidemiol*; 35(1):30-7.
9. Farrera P.(1997). *Medicina Interna*. 13a ed. Madrid: Ed. Doyma SA y Mosby Doyma Libros; 2304-7.
10. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition, *Pseudomonas aeruginosa*.
11. Fresney RI. (2000). *Culture of animal cell. A manual of basic technique*. Four edition. John Wiley and Sons Inc. New York.
12. Gonzales ME, Forero F, Sandoval A. (2010). Efecto del tratamiento enzimático de la extracción del aceite de aguacate. Ministerio de agricultura de Colombia. Asociación hortofrutícola de Colombia; 2: 1-62
13. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. (2008). ReAct-Action on antibiotic resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 813-21.
14. Hoffmann A.(1992). *Plantas Medicinales de Uso Común en Chile*. Santiago, Chile: Editorial Fundación Claudio Gay. 178.
15. Mandell GL, Benett JE, Dolin R. (2010). *Enfermedades infecciosas. Principios y practica 7º Edición*, Editorial Elsevier.
16. Mendoza Patiño N, Figueroa-Hernández JL. (2006). Herbolaria. *Rev Fac Med UNAM* 48(6); 248-249.
17. Morales C. (2001). Prevalencia puntual de infección nosocomial. *Rev cubana de enfermería*; 17: 84-9.
18. Mostacero J *et al.* (2011). *Plantas medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica*.1ª. Edición. Lima: Fondo editorial de la Asamblea Nacional de Rectores.
19. Nicas T, Hancock R. (1996). Outer protein HI of *Pseudomonas aeruginosa*. Involvement adaptative and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate polymixin and gentamycin. *J Bacterial*; 143:872-8.
20. OMS. (2007) WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance, Suiza.
21. Pier G B, Ramphal R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*. En Mandell, Douglas & Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, eds. Capítulo 219. 7 ed. Philadelphia: ChurchillLivingstone. An Imprint of Elsevier.
22. Pollack M.(2002). *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell, Douglas, Bennet eds. *Enfermedades Infecciosas: Principios y Prácticas*. 5ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana SA 2002; 2802-2834.
23. Rodríguez AN. Sánchez PP. 2005. *Especies de frutales cultivadas en Cuba en la Agricultura Urbana*. 3ra Edición, La Habana
24. Roig JT. (1974). *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. 2ª ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica.

25. Rojas JM, Peñuela AE, Rocío C, Aristizábal GE, Chaparro MC. (2004). Caracterización de los productos hortofrutícolas colombianos y 76 establecimientos de las normas técnicas de calidad. *Cenicafe*, Chinchina; 163-178
26. Ruiz Giraldo MC, Susunaga Susunaga CM. (2000). Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera greveolens* (BURSERACEAS), frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Ereinia caritovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinérea*. Carrera Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo Pregrado. Bogota DC. 40.
27. Salehi Surmaghi MH. 2010. *Medicinal Plants and Phytotherapy*, vol. 1, Donyay Taghziah Press, Tehran, Iran.
28. *Salud Pública de México*. (1999). vol.41. Cuernavaca.
29. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, *et al.* 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*; 406:959-964.
30. Trease Evans W.(2006). *Farmacognosia*. 15th ed. España: Editorial Elsevier Limited. 41-51.
31. Vilar D, Jacquemin B, Díaz A, Velázquez C, Volkow P. 2003. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmactectomizadas. *Salud Pública Méx*; 45(5):371-8.
32. Vivanco J, Cosío E, Loyola-Vargas V, Flores H. (2005). Mecanismos Químicos de Defensa en las Plantas. INVYCI. Prensa Científica, S.A. Versión on-line. España; 1-8.
33. Zargari A. (1996). *Medicinal Plants*, Tehran University Press, Tehran, Iran.

IMÁGENES TOPOGRÁFICAS DE *ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *KLEBSIELLA VARIICOLA*

Adriana Araceli Macías Reynoso¹, Virginia Villa-Cruz², Juna Elizabeth Alba Cuevas², Héctor Pérez Ladrón de Guevara², y Lily Xóchit Zelaya Molina³

¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Lagos, ² Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara, ³Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG).

adi8294@hotmail.com

RESUMEN

Las bacterias se encuentran en una amplia variedad de ecosistemas o diversos nichos ambientales, por ejemplo: *Escherichia coli*, miembro de la familia de *Enterobacteriaceas*, es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo, con flagelos peritricos; suele hallarse en los aparatos digestivos de ciertos mamíferos. *Staphylococcus aureus*, miembro de la familia de *Staphylococcaceae*, bacilo Grampositivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulada; se encuentra en una amplia diversidad de ecosistemas por todo el mundo. *Klebsiella variicola*, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo Gramnegativo, no formador de esporas, anaerobio facultativo; suele encontrarse en las plantas. Con una amplia variedad de bacterias, se requiere de la identificación y la organización de ellas. Para esto, se toma como base primaria la morfología que presentan (bacilos, cocos, vibrión, espirilos y espiroquetas), además del tamaño. Considerando que entre menor sea el tamaño de una bacteria se vuelve más difícil su identificación primaria. En las últimas décadas, el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), en Modo Contacto, se ha vuelto una herramienta fundamental para el análisis de superficie (bi y tridimensional) de materiales orgánicos e inorgánicos, a escala nanoscópica, sin embargo en el área de materiales biológicos es poco explorado su uso. Por lo que este trabajo tuvo la finalidad de caracterizar formas y tamaños bacterianos utilizando como herramienta el AFM, en Modo Contacto.

INTRODUCCIÓN

El continuo interés en el estudio de bacterias como parte fundamental del equilibrio de nuestro alrededor, ha aumentado en el mundo por su participación de forma vital en todos los ecosistemas y en relación continua con los animales, las plantas y el hombre. El permanente estudio es clave para la comprensión de la vida en el planeta, el cual participan procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológico, de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro (N.M. Montaña-Arias., 2010).

En el último siglo, el desarrollo de técnicas más robustas para el análisis morfológico de bacterias, aportan en la visualización, con más detalle, de la estructura morfológica de las bacterias. Además, se ha podido observar alteraciones o cambios en las estructuras celulares, como consecuencia a estrés genética ó exposición adversa a factores físicos y/o químicos (N.M. Montaña-Arias., 2010).

Las técnicas que se emplean para el análisis morfológico de bacterias, son principalmente, técnicas microscópicas. La primera técnica microscópica fue la microscopía óptica, esta técnica permite observar elementos que son imperceptibles a simple vista usando la luz visible. Después, se crearon microscopios de alta gama, denominados microscopios electrónicos. El TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) y el SEM (Microscopía Electrónica de Barrido) son técnicas que ocurren bajo los mismo fenómenos físico-atómicos, en ambas, se obtiene la morfología de una superficie con una gran profundidad de campo de alta resolución al identificar estructuras y superficies celulares. Después, cuando se creó el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) se volvió una herramienta funcional con principios electrónicos, mecánicos y ópticos, donde se utiliza una punta para medir las muestras y obtener topografías a un nivel de resolución a nivel subnanométrico (A.G. Cullis., 1974; M. Ipohorski., 2003; L. Johnson., 2008).

TEORÍA

Las bacterias las podemos encontrar en todo tipo de naturaleza, en el suelo, tierra, agua, aire; como parte simbiótica en animales, en plantas y en los seres humanos. Presentan generalmente una forma

alargada y con capacidad de reproducirse por fisión binaria. Tienen estructuras en común como la pared celular de peptidoglucano, ribosomas, ácido desoxirribonucleico, flagelo y pilis. Poseen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento (K. Carroll., 2016).

Las bacterias pueden distinguirse entre sí por su morfología (tamaño y forma) de su pared celular, la cual proporciona elasticidad y rigidez a la misma por sus propiedades metabólicas, antigénicas y genéticas. Con respecto a la forma, se agrupan en tres grupos principales: cocos, bacilos, entre otras. Los bacilos suelen tener variaciones en las terminaciones en ángulo recto, redondeadas, afiladas, engrosadas, en forma de maza, etc.; ello puede deberse a la propia forma de la bacteria o a la presencia de inclusiones o esporos (J. Liébana-Ureña., 2002; P. Murray, 2007; T. Vargas., 2014).

Esta diversidad morfológica puede variar debido a distintas circunstancias exógenas, como la antigüedad del cultivo, factores nutricionales, tratamiento con antibióticos, etc.; por otra parte, a las bacterias que tienen deficiencias en su pared o carecen de ella, como los micoplasmas, los cambios ambientales les afectan con mayor intensidad, por lo que no puede decirse que tengan un aspecto determinado. En un caso u otro, a las bacterias que modifican de forma se les denominan pleomorfas y al fenómeno, polimorfismo. Además, debido al proceso de división celular, puede que tras dividirse no permanezcan aisladas sino unidas entre sí formando agrupaciones que, al ser en algunos casos muy típicas, contribuyen a su identificación (J. Liébana-Ureña., 2002).

Existe una amplia diversidad bacteriana, se ejemplifican tres tipos de ellas: *Escherichia coli* es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo, fimbriado, comúnmente es móvil por flagelos peritricos y miembro de la familia de las enterobacterias, Suele hallarse en los aparatos digestivos de ciertos mamíferos. Debido a su alta patogenicidad, se le ha atribuido la causante de diarrea hemorrágica e incluso insuficiencia renal y hasta la muerte. *Staphylococcus aureus* es un bacilo Gram (+), anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada y miembro de la familia de Staphylococcaceae. Encuentra en una amplia diversidad de ecosistemas por todo el mundo. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas. *Klebsiella variicola* es un bacilo Gram (-), no formadora de esporas, anaerobio facultativo, sin motilidad y miembro de la familia Enterobacteriaceae. La cual se encuentra en diversos nichos ambientales, principalmente en plantas, además desempeña un papel en la fijación de nitrógeno atmosférico para la promoción del crecimiento de las plantas. También se ha descrito como la causa de un brote intrahospitalario, que puede provocar sepsis en pacientes hospitalizados, y como una causa frecuente de infecciones del torrente sanguíneo (P. Murray., 2007).

Desde la invención del microscopio, en 1668, por Anton Van Leeuwenhoek, las observaciones morfológicas de las bacterias han sido tema de interés científico. Estas observaciones, han dado pie a la caracterización primaria de las bacterias, que las identifica, organiza y agrupa. Así se tienen agrupaciones de bacterias en forma de bacilos, cocos, vibrión, espirilos y espiroquetas. Además, el análisis morfológico también puede revelar el tamaño celular (V. Charles., 2004, R. M. Sánchez-Lera., 2015).

Diferentes tipos de técnicas microscópicas se han empleado para el análisis morfológico celular, empleando microscopios ópticos hasta microscopios de alta resolución como son los electrónicos. En esta parte, el uso de la microscopía electrónica ha sido de gran utilidad, ya que al tener una alta resolución, se puede visualizar y analizar con más detalle la morfología de las bacterias. Sin embargo, como es una técnica altamente especializada, la adquisición y uso del equipo tiene un alto costo. Desde 1986, otro tipo de microscopía que se ha empleado, es el microscopio de fuerza atómica (AFM). Esta es una herramienta muy útil en la investigación a escala nanoscópica. En las últimas décadas, se ha extendido su uso, con éxito, en distintas áreas de investigación como tecnología de alimentos, ciencia de los polímeros y microbiología (S. Liu., 2011; S. Gangadoo., 2015; N. Gadegaard, 2006).

En el AFM, la imagen obtenida se basa en una representación física de la topografía de la superficie mediante escaneo de trama (movimientos en zigzag) de un lápiz óptico a través de la muestra (N. Gadegaard., 2006). Además, se puede usar para investigar las propiedades mecánicas de la muestra, así como las interacciones entre la punta y la muestra (G. Binnig., 1986; L. Johnson., 2008). El AFM utiliza el contacto directo entre la punta y la muestra, tiene la ventaja de requerir un mínimo

o incluso una nula preparación de la muestra. Además, proporciona imágenes 3D reales que pueden proporcionar una visión única de la estructura y el comportamiento funcional de los materiales (G. Binnig., 1986).

El AFM opera por dos métodos fundamentales: el Modo Contacto y Modo No Contacto, que se diferencian en la interacción de la punta del AFM con la muestra (G. Rodríguez-Crespo., 2013). En el Modo Contacto, la punta es acercada a la superficie de la muestra, a una distancia de 10-100 nm, se originan fuerzas de Van Der Waals, electrostáticas y magnéticas. Se emplea para el análisis morfológico de superficies sólidas, siendo ampliamente utilizado en el área de análisis de superficies de materiales (G. Rodríguez-Crespo., 2013). Para el caso de Modo No Contacto se utiliza para superficies suaves. La fuerza entre la muestra y la punta es constante y provoca una deflexión muy pequeña y homogénea, al interaccionar la punta contra la muestra. Se usa para la caracterización de muestras en medios líquidos, por ejemplo: funcionamiento de proteínas *in situ* (despliegamiento de proteínas), morfología estructural celular (G. Rodríguez-Crespo., 2013).

PARTE EXPERIMENTAL

Se emplearon las cepas de *Escherichia coli* (Strain K2, SIGMA), *Klebsiella variicola* (RJ2BD1) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), proporcionadas por el Centro de Recursos Genéticos (CNRG), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para su uso fueron inoculadas en medio nutritivo e incubadas a 36°C durante 24 horas. Para la identificación primaria, se hizo un análisis de la morfología colonial y celular, además de la tinción de Gram. Para el análisis de la morfología colonial, se hizo bajo la observación de la colonia en un estereoscopio. Para el análisis de la morfología celular, se hizo con Microscopía óptica (Labomed CxL) y con Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, marca NanoSurf, modelo EasyScan 2 de modos de contacto), éste último se hizo a diferentes resoluciones. Para ambas microscopías, las muestras fueron fijadas sobre un portaobjeto y coloreadas con Tinción Gram o Azul de metileno ó Azul de tripano. Posteriormente fueron observadas.

RESULTADOS

La morfología colonial de las cepas empleadas se observan en la figura 1. Para la cepa *Escherichia coli*, las colonias presentaron forma circular, lisas, color blanco transparente, convexas y opacas. Para el caso de *Staphylococcus aureus* se presentaron colonias redondas, cremosas, convexas y de bordes lisos, por último, la cepa de *Klebsiella variicola* presentó colonias con forma circular, convexas, borde ondulado y color beige. La técnica de tinción de Gram nos mostró que las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella variicola* son Gram (-), mientras que la cepa de *Staphylococcus aureus* es Gram (+).

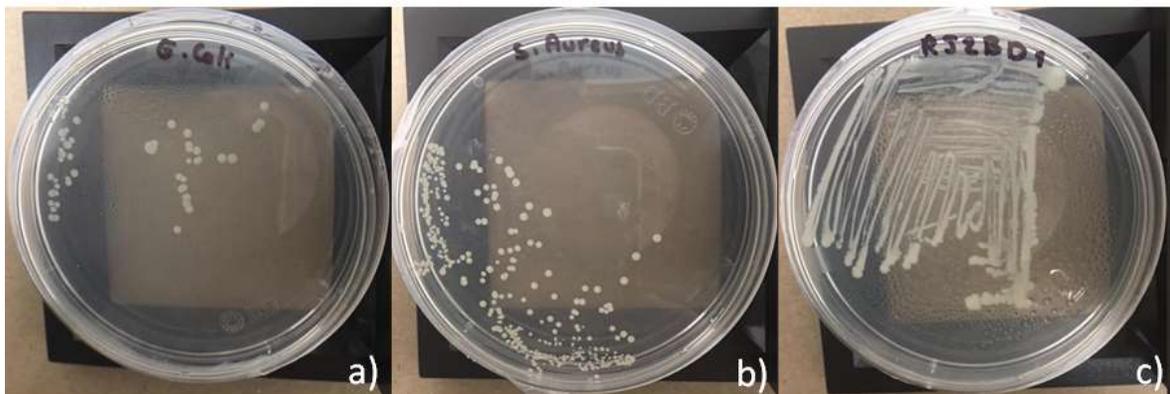


Figura 1. Morfología colonial de las cepas: a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus aureus* y c) *Klebsiella variicola*.

Con respecto a los resultados del AFM, en la figura 2 se muestran las topografías de *E. coli*, coloreadas con tinción Gram, con un rango de resolución de 70 μm , 20 μm y 5 μm . En la figura 3, se muestran las topografías de *E. coli*, coloreadas con azul de metileno, con rangos de resolución de 70 μm , 20 μm , 9 μm y en la figura 4, se muestran las topografías de *E. coli*, coloreadas con azul de tripano, con rangos de resolución de 70 μm , 23 μm y 6 μm . Como se puede apreciar, en todas las topografías se observan las formas que presentan *E. coli*. Las resoluciones que se usaron nos muestran topografías en donde se observa la forma que presenta *E. coli*, sin embargo, con resolución de 5 μm y 9 μm se puede apreciar, de forma individual, mejor la forma de *E. coli*. Con respecto al tratamiento de coloración que se les dio a las células, las muestras con azul de tripano nos proporcionaron topografías más limpias y claras, contrario a las muestras con tinción de Gram, que en ellas, aunque se observa la forma de *E. coli*, el aglomerado o agrupamiento de células dificulta la toma de la topografía y su observación. En todas las topografías obtenidas, se midió el tamaño celular, obteniendo un tamaño promedio de 1.04 x 3.35 μm .

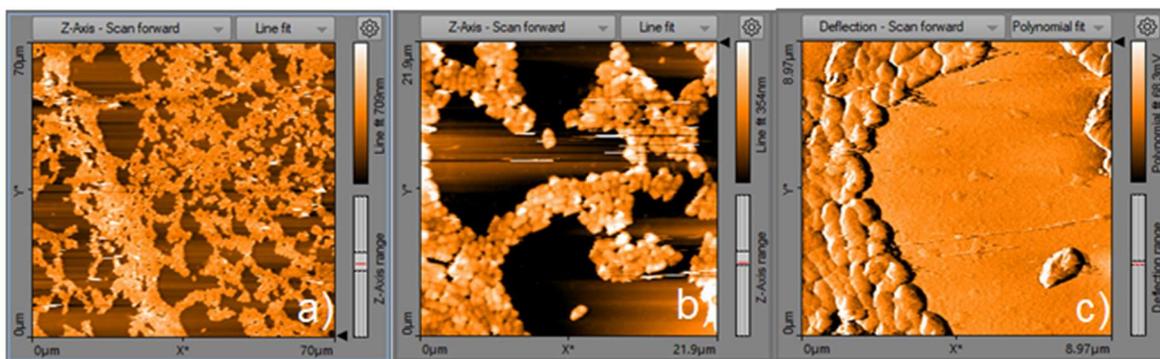


Figura 2. Muestra de *Escherichia coli* coloreada con Tinción Gram. 70 μm (a), 20 μm (b), 9 μm (c).

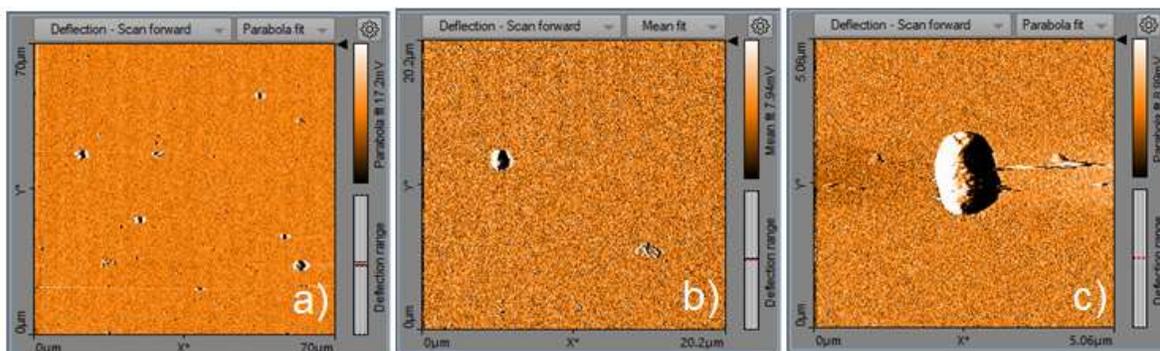


Figura 3. Muestra de *Escherichia coli* coloreadas con Azul de metileno. 70 μm (a), 20 μm (b), 9 μm (c).

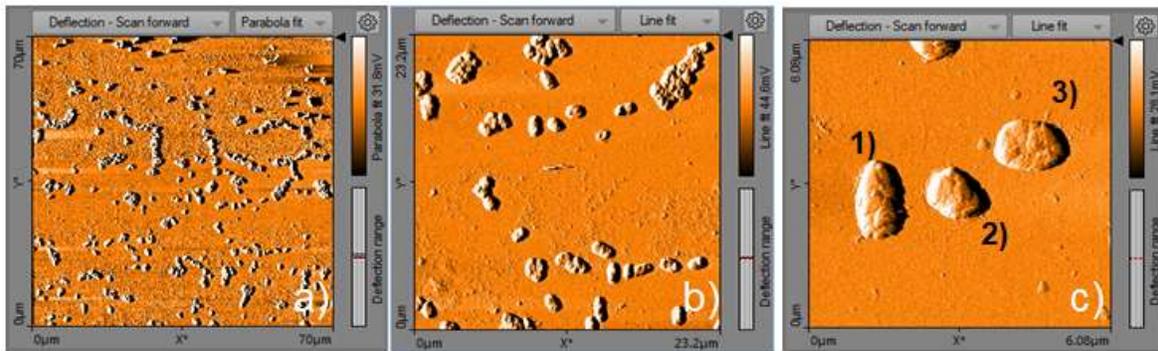


Figura 4. Muestra de *Escherichia coli* coloreada con Azul de tripano. 70 μm (a), 23 μm (b) y 6 μm (c).

El uso del AFM en Modo No Contacto, ha revolucionado las investigaciones científicas en el campo biológico, especialmente en la morfología de células. Mientras que el AFM, en Modo Contacto, ha revolucionado el campo científico en el análisis de materiales nanométricos. En estos resultados se muestran topografías obtenidas de *Escherichia coli* utilizando el AFM en Modo Contacto, como una posibilidad de usar el AFM en Modo Contacto, para analizar la morfología celular de algunas cepas, en este caso de *Escherichia coli*. Las topografías obtenidas, al ser comparadas con topografías de la misma bacteria, pero derivadas de AFM en Modo No Contacto, nos muestra el relieve de la forma bacteriana, además de medir el tamaño celular, sin embargo, no se visualiza la forma de *E. coli* como se reportan en las topografías de Lonergan (2014) y Gammoudi (2016), en donde hasta se muestran las estructuras de motilidad de la bacteria. Es importante mencionar que en ambos trabajos, utilizan muestras inmovilizadas de células de *Escherichia coli*. Por lo que, considerando estos trabajos, se puede aplicar los métodos de inmovilización y usar el AFM en Modo Contacto, para mejorar la observación *in situ* de la morfología bacteriana.

CONCLUSIONES

El AFM (Microscopio de Fuerza Atómica) es una técnica útil para la obtención de imágenes morfológicas de alta resolución en distintas disciplinas de la investigación. La aplicación de esta técnica en el área de microbiología ha aportado algunas ventajas respecto a otro tipo de microscopías. La observación de fotografías a partir de preparaciones simples de muestras vistas a resoluciones manométricas de 70 μm a 2 μm permite apreciar de forma individual las estructuras superficiales celulares. Además el tiempo es un factor muy importante para medición de muestras debido a que esta puede tardar tiempo máximo de 8 minutos por topografía, por lo que se pueden realizar la medición en tiempo real. Por lo tanto, esta técnica de microscopía puede reemplazar las microscopías siempre y cuando solo se requiera la topografía de la bacteria y tamaño de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. G. Evans, "Perspectiva on the development of high-toughness ceramics", J. Am. Ceram. Soc., Vol. 73, 2, 1990, pp. 187-206.
2. T. Kreis, "Speckle Metrology," in *Holographic Interferometry* (Akademie Verlag Inc., New York, NY, 1996), Chapter 4, pp. 125-149.
3. N. M. Montaña-Arias, "Los microorganismos: pequeños gigantes", Ciencia y cultura, Vol. 17, 77, 2010, pp. 15-23.
4. V. Charles, "Lo malo y lo feo de los microorganismos" (Universidad Nacional de Colombia Sede Bogota, 2004), Capítulo 1, pp. 17-41.
5. R. M. Sánchez-Lera, "History of the microscope and its repercussion on Microbiology" Humanidades Médicas; Vol. 15. 2, 2015, pp. 355-372.
6. J. Liébana-Ureña. "Microbiología Oral" McGRAW-HILL INTERAMERICANA. 2002. Capítulo 3 pp. 17-24.

7. K. Carroll, "JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG Microbiología médica", McGraw-Hill. 2016. Capítulo 1 y 2. pp 9-62.
8. P. R. Murray, "Microbiología médica". Editorial Elsevier. Ed. 5. 2007, pp 25-45.
9. T. Vargas. "Morfología bacteriana". Revista de Actualización Clínica. Vol. 49(2): 2014. pp. 2594-2598.
10. S. Liu. "A Review of the Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in Food Science and Technology". Advances in Food and Nutrition Research. Vol. 62. 2011. pp. 201-240.
11. S. Gangadoo. "Nanoparticle and biomaterial characterization techniques". Materials Technology, Advanced Performance Materials. Vol. 30. 2015. pp. 43-56.
12. N.E. Lonergan. "Immobilizing live Escherichia coli for AFM studies of surface dynamics. Ultramicroscopy. Vol. 137. 2014. pp. 30-39.
13. G. Rodríguez-Crespo, "Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), modos de operación y aplicaciones". Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC) 2013.
14. A. G. Cullis. "High-resolution topographical imaging by direct transmission electron microscopy". The Philosophical Magazine: A Journal of Theoretical Experimental and Applied Physics. Vol 30. 1974. pp. 447-451.
15. M. Ipohorski. "Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales". CIENCIA E INVESTIGACIÓN. Vol. 63. 2013. pp. 43-53.
16. L. Johnson. "Atomic Force Microscopy (AFM) for Rubber". Rubber Chemistry and Technology. Vol 8. .2008. pp. 359-383.
17. N. Gadegaard. "Atomic force microscopy in biology: technology and techniques" Biotechnic and Histochemistry. Vol. 81. 2006. pp. 87-97.
18. T. Vargas. "Morfología bacteriana". Revista de Actualización Clínica. Vol. 49. 2014. pp. 2594-2598.
19. I. Gammoudi." Morphological and nanostructural surface changes in Escherichia coli over time, monitored by atomic force microscopy". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 141. 2016. pp. 355-364.
20. G. Binnig. "Atomic force microscope". Physical Review Letters. Vol. 56. 1986. pp. 930-933.

PODER ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE TOMILLO (*THYMUS VULGARIS*) EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, ORO Y COBRE.

José Martín Hernández Girón, Lidia Meléndez Balbuena, Alejandro Cesar Ruiz Tagle, Mónica Cruz Hernández, Ismael Soto López

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
martin950303@gmail.com

RESUMEN

En los últimos años las nanopartículas de plata, oro y cobre han sido objeto de una variedad de estudios, debido a que presentan un comportamiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas que es inusual en relación a las mismas partículas de mayor escala, además de su sorprendente actividad antimicrobiana. El presente trabajo describe una ruta de síntesis eco-amigable para obtener nanopartículas de oro, plata y cobre, usando los extractos de las hojas de Tomillo (*thymus Vulgaris*). Las nanopartículas de plata, oro y cobre preparadas por este método fueron caracterizadas por el color característico de las disoluciones de nanopartículas para cada uno de los metales. Las mediciones con espectroscopia UV-Vis de las disoluciones acuosas de los iones metálicos de plata, oro y cobre, después de entrar en contacto con el extracto vegetal de Tomillo (*thymus vulgaris*) a diferentes pH, mostraron una banda de absorción intensa alrededor de los 400-450 nm, característica de la resonancia del plasmón de las nanopartículas de plata, a 500 -600 nm las de oro y alrededor de los 350-400 nm las de cobre como óxido de cobre (I). A través del escaneo de las muestras por medio de AFM (*atomic force microscopy*) se obtuvo información morfológica de las nanopartículas de plata, a partir de imágenes topográficas 3D de las mismas, como distribución, tamaño y forma de las nanopartículas de plata. Finalmente, se comprobó su actividad antibacteriana de las tres soluciones de las nanopartículas de plata AgNPs frente a la cepa de *Escherichia coli*. Se probó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos en agar Mueller-Hinton.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las nanopartículas de plata, oro y cobre han sido objeto de una variedad de estudios, principalmente debido a la relación que existe entre su tamaño con las propiedades ópticas, en la escala nanométrica (10-100 nm), presentan un comportamiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas que es inusual en relación a las mismas partículas de mayor escala, además de su sorprendente actividad antimicrobiana. En la actualidad, se han encontrado aplicaciones importantes en electrónica, marcadores celulares, en catálisis química, biosensores, biotecnología, etc, sin embargo, una de las aplicaciones donde han enfocado una buena parte de la investigación es en sus destacadas propiedades como agentes bactericidas o fungicidas¹. Por su amplio campo de aplicación existe un creciente interés en desarrollar procesos de síntesis amigables con el ambiente que eviten el uso de productos químicos tóxicos, por lo que los extractos vegetales acuosos resultan una opción promisoría dado que contienen entre sus componentes agentes reductores aptos para la síntesis de las nanopartículas. Por otra parte, la situación actual, exige la búsqueda de metodologías que no sean tóxicas y no perjudiquen el medio ambiente, además de que no requieran excesivos gastos en infraestructura y que de alguna u otra forma sean factibles.

Para la producción de nanopartículas plata, oro y cobre se han propuesto diferentes estrategias de síntesis, entre las que se incluye, la síntesis química y más recientemente la aplicación de métodos biológicos que hacen uso plantas y sus extractos. Los extractos vegetales resultan una opción promisoría dado que contienen entre sus componentes agentes reductores como compuestos polifenólicos y flavonoides con bajos potenciales redox, aptos para la síntesis de las nanopartículas de metales como la plata, oro y cobre². El presente trabajo describe una ruta de síntesis eco-amigable para obtener nanopartículas de oro, plata y cobre, usando los extractos de las hojas de Tomillo (*thymus Vulgaris*). La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo utilizando las sales de nitrato de plata AgNO₃, para las de oro H(AuCl₄) y para las de cobre CuSO₄ (II) y como agente reductor extracto acuoso de Tomillo. Las nanopartículas de plata, oro y cobre preparadas por este método fueron caracterizadas por el color característico de las disoluciones de nanopartículas para cada uno de los metales. Las mediciones con espectroscopia UV-Vis de las disoluciones acuosas

de los iones metálicos de plata, oro y cobre, después de entrar en contacto con el extracto vegetal de Tomillo (*thymus vulgaris*) a diferentes pH, mostraron una banda de absorción intensa alrededor de los 350-450 nm, característica de la resonancia del plasmón de las nanopartículas de plata³, a 500 -600 nm las de oro⁴ y alrededor de los 350-400 nm las de cobre como óxido de cobre (II)⁵. A través del escaneo de las muestras por medio de AFM (*Atomic Force Microscopy*) se obtuvo información morfológica de las nanopartículas de plata, a partir de imágenes topográficas 3D de las mismas, como distribución, tamaño y forma de las nanopartículas de plata. Finalmente, se comprobó su actividad antibacteriana de las tres soluciones de las nanopartículas de plata, oro y cobre frente a la cepa de *Escherichia coli*. Se probó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos en agar Mueller-Hinton.

TEORÍA

Nanopartículas metálicas.

Las nanopartículas metálicas como las de la plata, oro y cobre han sido estudiadas ampliamente debido a sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas únicas, con aplicaciones en farmacología, medicina, procesamiento de alimentos y agricultura⁶.

La síntesis de las nanopartículas metálicas se puede realizar mediante reducción química, electroquímica y fotoquímica, radiación UV, ablación láser, síntesis asistida por ultrasonido y microonda, entre otros⁷.

La reducción química de sales metálicas en disolución es el método más ampliamente extendido para la síntesis de nanopartículas metálicas. La obtención de átomos metálicos en estado de oxidación cero mediante un proceso químico requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas para así obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una propiedad determinada. En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución se lleva a cabo mediante el empleo de los siguientes componentes: i) precursor metálico; ii) agente reductor; iii) agente estabilizante. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones metálicos consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una alta energía de activación mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.)⁹.

Dichos procesos suelen tener un costo elevado e implican el uso de disolventes orgánicos y agentes reductores tóxicos, como el borohidruro de sodio y la N,N-dimetilformamida⁸.

Síntesis con extractos vegetales

Por otro lado, la síntesis biológica ha surgido como una opción nueva para obtener materiales a nanoescala, principalmente como resultado de la necesidad creciente de utilizar métodos de síntesis amigables con el ambiente. La biosíntesis implica el uso de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos) o extractos vegetales para lograr la reducción de iones metálicos, incluyendo plata, oro y cobre¹⁰. Es de particular interés que los extractos de plantas que actúan como agentes reductores pueden proporcionar una vía rápida para la preparación de nanopartículas, son antioxidantes naturales, generalmente constituidos por mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica se encuentran presentes en las plantas y sus extractos vegetales, que contienen antioxidantes, entre los cuales los más importantes son los compuestos polifenólicos, flavonoides y taninos, compuestos con alta capacidad antioxidante y bajos potenciales redox. Los bajos potenciales redox de estos antioxidantes hacen termodinámicamente favorable la reducción de la gran mayoría de radicales libres y algunos metales¹⁹. Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo¹¹, la figura 1, muestra su estructura química de uno de ellos, ácido gálico.

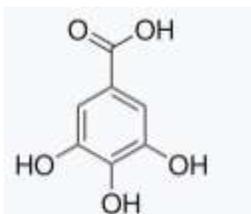


Figura 1. Ácido gálico, compuesto polifenólico.

Tomillo (*thymus Vulgaris*)

Se trata de una planta aromática (su nombre genérico proviene del verbo griego *Thym*, en alusión a su intenso y agradable aroma), vivaz, leñosa, de 10-40 cm de altura y muy ramificada. Su aceite esencial está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol. También contiene flavonoides, como luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol²⁰. La figura 2, muestra la estructura química de uno de sus componentes, la naringenina.

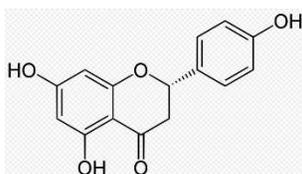


Figura 2. Estructura química de la naringenina.

PARTE EXPERIMENTAL

Es importante tener en cuenta que en la síntesis de nanopartículas metálicas se requiere seguir un protocolo de síntesis extremadamente riguroso con los reactivos usados, como su pureza, la forma y el orden en que se mezclan y todo tipo de factores físicos y químicos, en especial la concentración de los reactivos, la temperatura, la forma e intensidad de la agitación y el pH.

Para la Síntesis de las nanopartículas de plata AgNPs se utilizó una disolución acuosa de AgNO_3 10^{-3} Molar (Sigma-Aldrich), para las de oro AuNPs una disolución acuosa de HAuCl_4 10^{-3} Molar (Sigma-Aldrich), y para las de cobre una disolución acuosa de CuSO_4 10^{-3} Molar (Sigma-Aldrich), como agente reductor de estos metales en forma iónica, Ag^{1+} a Ag^0 , Au^{3+} a Au^0 y Cu^{2+} a Cu^0 se empleó el extracto vegetal acuoso de Tomillo (*thymus vulgaris*). Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó agua desionizada, se llevó a cabo a temperatura ambiente, se utilizó agua porque tiene una elevada capacidad de extracción de polifenoles y no presenta toxicidad. Con la finalidad de determinar el efecto de la variación del pH en la formación de las nanopartículas de los metales estudiados, se trabajó a valores de pH de 5, 7, 8 y 9 bajo las mismas condiciones de concentración y temperatura.

Preparación del extracto acuoso de Tomillo (*thymus vulgaris*). El extracto vegetal fue preparado utilizando 1 g de hojas de Tomillo (*thymus vulgaris*), en 100 mL de agua desionizada en ebullición, hasta reducir a un volumen de 70 mL. Esta infusión se filtra y se deja enfriar. Los extractos se almacenaron a 4°C .

Síntesis de Nanopartículas plata AgNPs y oro AuNPs.

Nanopartículas de plata AgNPs. Para la síntesis de las nanopartículas de plata, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, adicionando 10 mL de la solución de AgNO_3 0.001 Molar a una dilución de (agua/ extracto) de 29.5: 5 (30 mL) de Tomillo (*thymus vulgaris*) al cual se adicionó NaOH 0.001 M, hasta llegar a pH=5, pH=7, pH=8 y pH=9, las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo agitación constante por 15 minutos. Estas soluciones se dejaron reposar y se almacenaron para posteriores análisis.

Nanopartículas de oro AuNPs. Para su síntesis se partió de una solución acuosa de HAuCl_4 0.001 M a temperatura ambiente se adicionaron 10 mL a una dilución de (agua/ extracto) de 29.5: 5 (30

mL) de Tomillo. cuya concentración se mantuvo constante, a los que se les añadió gotas de solución de NaOH 0,001 M (durante la preparación de la solución obteniendo diferentes valores de pH), las soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo agitación constante por 15 minutos. Estas soluciones se dejaron reposar y se almacenaron para posteriores análisis.

Síntesis de Nanopartículas de cobre CuNPs.

Nanopartículas de cobre CuNPs. A 4 mL de sulfato de cobre (II) 0.001 M, se adicionó 0.5 mL de etilendiamina al 10 % y 10 mL de extracto de Tomillo (*thymus vulgaris*), ajustando el pH con la adición de NaOH 0.001M, con agitación constante a temperatura ambiente, se dejó reaccionar por 5 minutos.

Caracterización

Las nanopartículas obtenidas de plata, oro y cobre fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-Vis, técnica que ha probado ser muy útil para el análisis rápido de las disoluciones coloidales de las nanopartículas de metales, permitiendo saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de nanopartículas. Los espectros UV-Vis se registraron con un espectrofotómetro Lambda 35 (Perkin Elmer) de doble haz en un intervalo de longitudes de onda entre 350 y 700 nm usando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se basa en que la reducción de los iones metálicos produce disoluciones que en el caso de la plata tienen un color amarillo con una banda intensa (resonancia del plasmón) entre 300-450 nm indicando la presencia de nanopartículas de plata, para el oro esto se produce a longitudes de onda en torno a 400-520 nm y se obtienen soluciones que van desde el rosa hasta el morado dependiendo del tamaño de las nanopartículas y para la presencia de las nanopartículas de cobre se esperan disoluciones de color rojizo y una banda de plasmón entre 500-600 nm, comportamiento atribuido en los tres casos a la excitación colectiva de los electrones en la superficie de las partículas (absorción plasmónica superficial)¹². Dicho espectro de absorción presenta alta sensibilidad a cambios en la morfología, tamaño y medio de dispersión de las nanopartículas¹³. Esta propiedad óptica de la aparición de la resonancia del plasmón permite caracterizar a las nanopartículas metálicas, además de poder determinar mecanismos de formación y crecimiento de las mismas. Si el máximo de absorbancia está a longitudes de onda más bajas indica que las NPs formadas son de tamaño más pequeño, mientras que un desplazamiento a longitudes de onda más altas indicará que éstas tendrán un tamaño mayor.

Actividad antibacteriana.

Se comprobó la actividad antibacteriana de la solución de las nanopartículas de plata obtenidas con el extracto de Tomillo (*thymus vulgaris*) a pH = 8, frente a la cepa de *Escherichia coli*. Se probó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos en agar Mueller-Hinton.

RESULTADOS

De las reacciones químicas propuestas con el extracto de Tomillo (*thymus vulgaris*) como agente reductor de los iones metálicos de plata⁺¹ y oro Au³⁺ se obtuvieron en ambos casos, disoluciones coloridas con propiedades coloidales características de nanopartículas metálicas de cada elemento Ag y Au.

En el caso de las disoluciones obtenidas de nanopartículas de plata son de color amarillo ámbar, color característico reportado en la bibliografía¹. La figura 3, muestra las coloraciones obtenidas de cada una de ellas a diferente pH, poniendo en evidencia la reducción del ion plata Ag¹⁺ a Ag⁰ y en consecuencia la probable formación de las nanopartículas de plata. Esta coloración se presenta pocos minutos después de haber agregado el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*).



Figura 3. Soluciones de nanopartículas de plata con extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a diferentes pH, 5, 7, 8 y 9.

Para el caso de las soluciones de oro obtenidas al adicionar el extracto de tomillo a la solución de HAuCl_4 , se obtuvieron diferentes coloraciones dependiendo fuertemente del pH, colores que van desde el rosa, azul y morado, reportados en la bibliografía⁴. Esta coloración se presenta pocos minutos después de haber agregado el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*). Los diferentes colores ponen de manifiesto que los tamaños de las nanopartículas obtenidas son diferentes y que es afectado por el pH. La figura 4, muestra las soluciones de las nanopartículas de oro a diferentes pH.

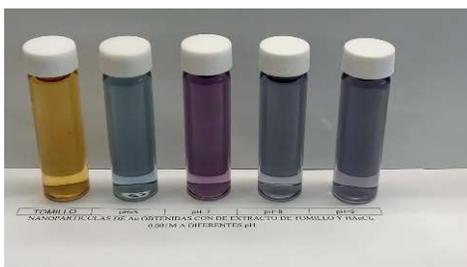


Figura 4. Soluciones de nanopartículas de oro preparadas con el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a diferentes pH, 5, 7, 8 y 9.

NPs de Cu metálico

Durante la síntesis de las nanopartículas de cobre metálico se esperaba un cambio del color morado (disolución del complejo de etilendiamina de cobre(II)) a rojizo, prueba de que las NPs metálicas de cobre se han formado, sin embargo el color obtenido de la reacción de la disolución de cobre (II), al contacto con el extracto de Tomillo (*thymus vulgaris*) se tornó en un color ocre, como se ilustra en la figura 5, este color es característico de la formación de nanopartículas de Cu_2O que se caracterizan por un cambio de color durante el proceso de síntesis a un color ocre, esto es debido a que el cobre reacciona rápidamente con el oxígeno de la atmósfera. Su síntesis química hace que estas NPs se obtengan generalmente en forma de sólido ya que no son solubles en agua ni en etanol. Aunque cuando se mezclan con uno de estos dos reactivos se observa una mezcla homogénea¹⁴. Cuando se deja, reposar el sólido (las NPs) vuelve a precipitar formando una disolución heterogénea.

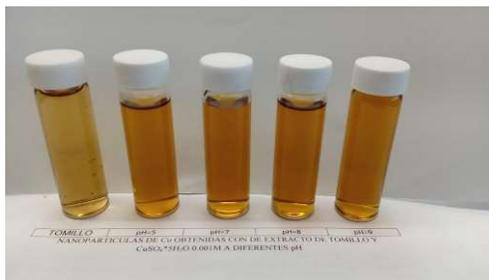


Figura 5. Soluciones de nanopartículas de cobre preparadas con el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a diferentes pH, 5, 7, 8, 9.

Resultados del UV-Vis

Para continuar con el análisis de las soluciones en las cuales se obtuvo evidencias de la síntesis de nanopartículas por el cambio de color, se usó el método de resonancia de plasmón de superficie (o SPR por sus siglas en inglés), éste consiste en estudiar las propiedades ópticas de los metales nobles por la oscilación de los electrones de conducción causada por su interacción con la radiación electromagnética¹⁵. Para esto se realizaron mediciones UV-visible de todas las soluciones.

Las mediciones de la espectroscopia UV-Vis de la disolución acuosa de la plata después de entrar en contacto con el extracto vegetal de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a pH=5, pH = 7, pH = 8 y pH=9 mostraron una coloración amarilla ámbar y bandas intensas de absorción características de la resonancia del plasmón de nanopartículas de plata, resultado que se atribuye su formación.

La figura 6. Muestra el espectro de UV-Vis de las soluciones de nanopartículas de plata a diferentes pH, para los casos de pH 7, 8 y 9, se observa picos de absorbancia correspondiente al plasmón de resonancia entre los 350nm y 450 nm, tal y como ha sido reportado en otros procesos de síntesis de nanopartículas de plata¹⁶ indicando su presencia. Bandas consideradas como características de las soluciones de nanopartículas de plata, la forma y ancho de las bandas revelan que las nanopartículas de plata obtenidas son polidispersas y muy probablemente esféricas, siendo menos el efecto de polidispersidad¹⁷ para el caso de pH 8 y 9

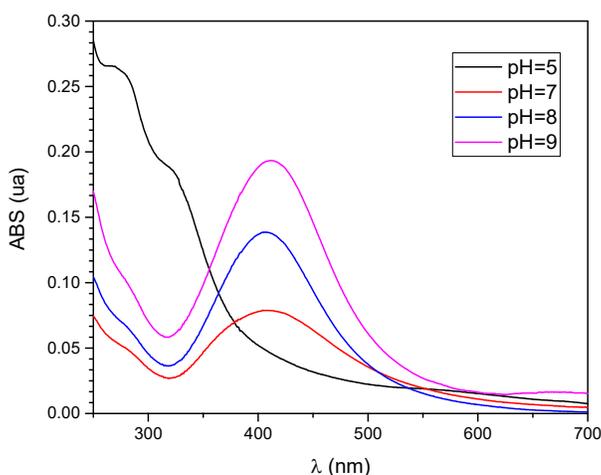


Figura 6. Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de plata AgNPs, obtenidas con extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) y $AgNO_3$ 10^{-3} M a diferentes pH.

La Tabla 1, presenta un resumen de resultados de UV-Vis, así como el tamaño probable de las nanopartículas de plata, según datos reportados en estudios anteriores.

Tabla 1. Longitudes de onda y tamaño estimado de las nanopartículas de plata obtenidas a diferentes pH.

AgNPs con extracto de Tomillo (<i>Thymus Vulgaris</i>) a diferentes pH.	Longitud de onda correspondiente al pico del plasmón.	Tamaño estimado en nanómetros (nm)
pH = 5	0	-
pH = 7	413 nm	30 nm-40 nm
pH = 8	405 nm	25 nm
pH = 9	401 nm	20 nm

Efecto del pH sobre el tamaño de partícula. El pH es un parámetro muy importante; influye directamente sobre los potenciales de reducción del agente reductor, por cuanto incide en el proceso de nucleación y crecimiento de la NPs, obteniendo así diversos tamaños. Así se aprecia en el gráfico de la figura que a medida que el pH se incrementa el corrimiento de la banda a longitudes de onda más bajas poniendo en evidencia tamaños menores de las nanopartículas formadas.

Las mediciones de la espectroscopia UV-Vis de la disolución acuosa de oro, después de entrar en contacto con el extracto vegetal de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a pH=5, pH = 7, pH = 8 y pH=9 mostraron diferentes coloraciones al variar el pH, y bandas intensas de absorción entre 500nm y 600 nm, características de la resonancia del plasmón de nanopartículas de oro, resultado que se atribuye su formación. La figura 7, muestra el espectro de UV-Vis de las soluciones de nanopartículas de oro a diferentes pH.

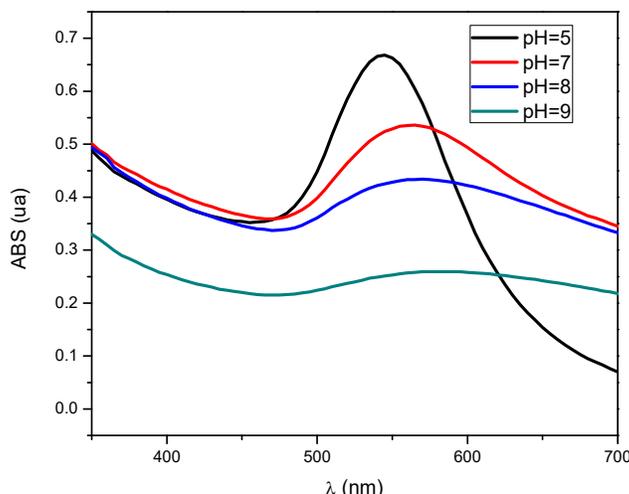


Figura 7. Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de oro obtenidas con extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) y H_{AuCl}₄ 10⁻³ M a diferentes pH.

Del espectro de UV-Vis se puede apreciar la influencia del pH, mostrando un corrimiento de la banda hacia longitudes de onda menores a medida que el pH disminuye, favoreciendo tamaños pequeños de nanopartículas de oro formadas. La tabla 2, muestra la longitud de onda a la que se lleva a cabo la máxima absorbancia para cada pH y su probable tamaño, según estudios realizados en esta área. La forma y ancho de las bandas revelan que las nanopartículas de oro obtenidas son polidispersas y muy probablemente semiesféricas⁴.

La Tabla 2, presenta un resumen de resultados de UV-Vis, así como el tamaño probable de las nanopartículas de plata, según datos reportados en estudios anteriores.

Tabla 2. Longitudes de onda y tamaño estimado de las nanopartículas de oro obtenidas a diferentes pH.

AuNPs con extracto de Tomillo (<i>Thymus Vulgaris</i>) a diferentes pH.	Longitud de onda correspondiente al pico del plasmón.	Tamaño estimado en nanómetros (nm)
pH = 5	545 nm	60
pH = 7	565 nm	70
pH = 8	570 nm	80
pH = 9	580 nm	90

Como se mencionó anteriormente las nanopartículas de cobre mostraron un color ocre característico de nanopartículas de Cu_2O , la caracterización mediante espectroscopia de UV-Vis de éstas NPs muestra que absorben a longitudes de onda entre 400-520 nm.

La figura 8, muestra el espectro de UV-Vis de las soluciones de cobre obtenidas a diferentes pH, se observa bandas de absorbancia correspondiente al plasmón de resonancia entre los 400nm y 520 nm, bandas consideradas como características de las soluciones de nanopartículas de Cu_2O ¹⁸, la forma y ancho de las bandas revelan que son polidispersas. El resultado corrobora que no se formaron nanopartículas de cobre, en su lugar se formaron las nanopartículas de Cu_2O .

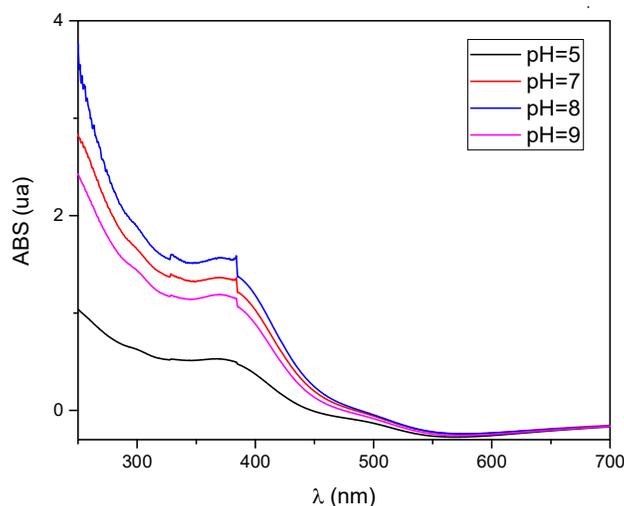


Figura 8. Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de Cu_2O obtenidas con extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a diferentes pH.

Del espectro de UV-Vis se puede apreciar la influencia del pH, mostrando un corrimiento muy débil de la banda hacia longitudes de onda menores a medida que el pH aumenta, Por lo que se puede pensar que en este caso el pH, no está afectando el tamaño de las nanopartículas de cobre.

Caracterización de las nanopartículas de plata AgNPs por Microscopía de Fuerza Atómica AFM.

Para confirmar el tamaño y distribución de las nanopartículas de plata obtenidas se caracterizaron por Microscopía de Fuerza Atómica AFM (Equipo JSPM-5200). El estudio topográfico realizado a las muestras permite determinar la presencia de las nanopartículas en forma de agregados, así como su morfología y sus intervalos de distribución de tamaño. Las Figuras 9, muestran las fotografías de los diferentes escaneos realizados a la muestra de nanopartículas de plata obtenidas con el extracto acuoso de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a pH=8.

En la Figura 9 y 10 se observa la imagen AFM topográfica ($2.01 \mu\text{m} \times 2.01 \mu\text{m} \times 87.9 \text{ nm}$) en modo "shaded" de las nanopartículas de plata obtenidas con el extracto Tomillo (*thymus Vulgaris*) a PH =8, se aprecian partículas semiesféricas, diseminadas heterogeneamente sobre la superficie de la oblea de silicio. Se observan zonas con agregados de nanopartículas de tamaño considerable, aunque también presenta zonas donde hay menor cantidad de agregados y tamaños menores hasta de 69 nm. El análisis de polidispersidad mostró por su parte que las partículas obtenidas con dicha solución mostraron alta dispersión.

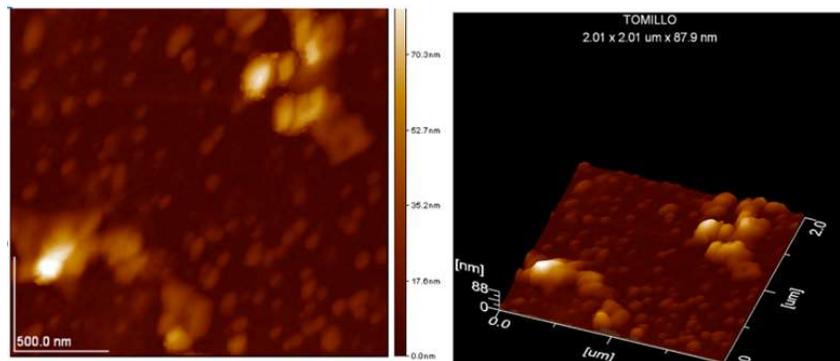


Figura 9. Imagen del escaneo de $2.01 \mu\text{m} \times 2.01 \mu\text{m} \times 87.9 \text{ nm}$, en modo “shaded” de las nanopartículas de plata AgNPs preparadas con el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*).

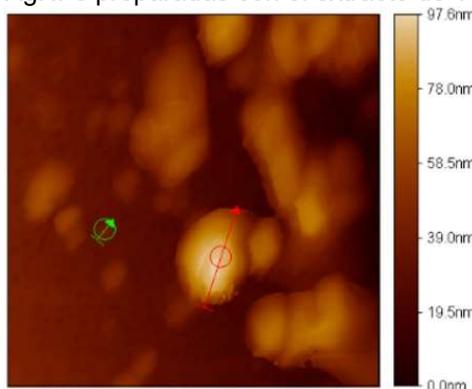


Figura 10. Imágenes del escaneo a $256.9 \text{ nm} \times 256 \text{ nm} \times 97.6 \text{ nm}$, modo “shaded” de las nanopartículas de plata preparadas con el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*), mostrando el tamaño de una nanopartícula de 69 nanómetros.

Actividad antimicrobiana de AgNPs frente *Escherichia Coli* (bacteria gramnegativa).

Se probó la actividad antimicrobiana por el método de difusión en pozos en agar Mueller-Hinton, para las nanopartículas de plata AgNPs preparadas con el extracto de Tomillo (*thymus Vulgaris*) a un pH = 8. El reto microbiano incluyó *Escherichia Coli* (bacteria gramnegativa). La figura 8, muestra la placa en donde se observa el halo de inhibición con un diámetro de 10 mm. Se considera que las nanopartículas de plata actúan con una actividad moderada sobre la cepa de *Escherichia coli*.

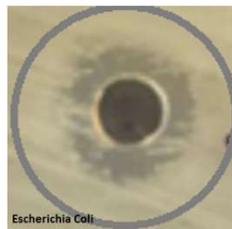


Figura 8. Placa en donde se observa el halo de inhibición de las AgNPs frente a *E. coli*.

CONCLUSIONES

Se desarrolló la síntesis de nanopartículas de plata, oro y óxido de cobre I, aplicando un método amigable para el medio ambiente, comparado con los químicos que originan subproductos no deseados. Por tal motivo, el uso del extracto acuoso de Tomillo resulta económico y menos perjudicial para el medio ambiente y con resultados acertados para la síntesis de nanopartículas.

Los coloides obtenidos en todos los casos presentaron el color característico de las nanopartículas de los metales de plata, oro y óxido de cobre I. Las mediciones de la espectroscopia UV-Vis de las disoluciones acuosas de los tres metales plata, oro y cobre después de entrar en contacto con el extracto vegetal de Tomillo a pH=5, pH = 7, pH = 8 y pH=9 mostraron bandas intensas de absorción características de la resonancia del plasmón de nanopartículas de plata, oro y óxido de cobre (II) resultado que se atribuye su formación.

El estudio de la Microscopía de Fuerza Atómica AFM, permitió corroborar la formación de las nanopartículas de plata, revelando las zonas donde se encuentran agregadas las nanopartículas, así como su morfología y sus variados tamaños. Se observa una actividad moderada de las AgNPs preparadas sobre la cepa de *Escherichia coli*, considerada como evidencia de su efectividad como bactericida frente a esta cepa.

Los resultados permiten corroborar que en efecto es posible obtener nanopartículas mediante el uso de este método natural y que es necesario controlar o modificar en futuras investigaciones otras variables experimentales (pH, tiempo de reacción y temperatura) para asegurar una mayor monodispersidad y controlar el tamaño de las nanopartículas sintetizadas de esta manera.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. Krishna & M. Singara, "Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties". *Journal of Experimental Nanoscience*, 2016 vol. 11, no. 9, 714-721.
2. M. Naczka & F. Shaidi, Phenolic in Cereals, Fruit and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 41, 1523-1542.
3. M. Monge, "Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas". *Real Sociedad Española de Química. An. Quím.*, 2009, 105(1), pp. 33-41.
4. N. T. H. Lien, V. X. Hoa, V. T. T. Duong, N.V y T.H. Nhung. "Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles for biomedical applications". *Communications in Physics*, 2011, 21(1): 63-69.
5. W. A. Murray & W. L. Barnes. "Plasmonic materials". *Adv. Mater*, 2007, 19, 3771-3782.
6. I. Sondi & B. Salopek-Sondi, B. "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. Coli* as a model for Gram-negative bacteria". *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 275(1), 177-182.
7. B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal & A. Debut. "Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract". *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 24(1), 45-50. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.09.006
8. S. Raja, V. Ramesh, & V. Thivaharan (2017). "Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability". *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10(2), 253-261. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.06.023
9. C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.*, 2005, 105, 1025-1102.
10. M. Sastry, A. Ahmad, M. I. Khan, & R. Kumar (2003). "Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete". *Current science*, 2003, 85(2), 162-170.
11. M. Naczka & F. Shaidi "Phenolic in Cereals, Fruit and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 1523-1542.
12. S. Kapoor. "Preparation, characterization, and surface modification of silver nanoparticles". *Langmuir*, 1998, 14, pp. 1021-1025.
13. L. D. Cruz, M. C. Rodríguez, L. J. López & V.M. Herrera, G. A. Orive, H. A. Creus. "Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie una relación profunda". *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2012, 3(2), pp. 67-78.
14. M. Esteban, H. Meyer, J. Kim, C. Gemel, A. Roland, F. J. Christoph. "Comparative Synthesis of Cu and Cu₂O Nanoparticles from Different Copper Precursors in an Ionic Liquid or Propylene Carbonate". *European Journal of Inorganic Chemistry* [online]. 2016, 2016(13-14), 2106-2113.

15. A. R. Bijanzadeh, M. R. Vakili and R. Khordad. "A study of the surface plasmon absorption band for nanoparticles" International Journal of Physical Sciences Vol. 7(12), pp. 1943 - 1948, 16 March, 2012 Available online at <http://www.academicjournals.org/IJPS> DOI: 10.5897/IJPS11.893 ISSN 1992 - 1950 © 2012 Academic Jour
16. T. J. I. Edison & M. G. Sethuraman. "Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using Punica granatum peel and its application as a green catalyst for the reduction of an anthropogenic pollutant 4-nitrophenol". Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013,104, 262-264.
17. M. Majles, Z. Dehghani, R. Sahraei and G. Nabiyouni. "Non-linear optical properties of silver nanoparticles prepared by hydrogen reduction method". Elsevier optics communications, 2009, 283: 1650-1653.
18. A. Khan, R. Audil, Y. Rafia and C. Ren. "A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles. International Nano Letters [online]. 2016, 6(1), 21–26.
19. R. M. Han, J. P. Zhang & L. H. Skibsted. "Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants". *Molecules*, 2012, 17: 2140-2160.
20. C. A. Barrera y G. Eunice. "Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia". *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2013, vol.18, n.2, pp.237-246. ISSN 1028-4796.

SISTEMAS BIOADHESIVOS PARA LA INCORPORACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS NATURALES CON APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRIA

Ana Karen Saldívar Vázquez¹, Mayra Treviño Garza², Juan Gabriel Báez González², Sonia Martha López Villarreal³, Laura Elena Villarreal García¹, Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis¹.

Universidad Autónoma de Nuevo León

¹Facultad de Odontología, ²Facultad de Ciencias Biológicas.

karen.saldivar12@hotmail.com

RESUMEN

La bioadhesión connota la unión de un sistema portador de fármacos a una ubicación biológica específica, por ejemplo, tejido epitelial. Si el sitio biológico es una capa de moco, el fenómeno se conoce como mucoadhesión. El concepto de mucoadhesión se introdujo en el campo de los sistemas de liberación controlada de fármacos a principios de la década de 1980. Objetivo: Evaluar los sistemas bioadhesivos para la incorporación de principios activos naturales con aplicación en odontopediatría. Los sistemas bioadhesivos se han utilizado desde hace mucho tiempo en el desarrollo de productos para diversas aplicaciones biomédicas. Una gran cantidad de polímeros mucoadhesivos se han utilizado para diseñar diversas formulaciones, como tabletas, hidrogeles, microesferas, nanopartículas, parches, películas, cada uno de los cuales proporciona una liberación sostenida y controlada. En la región bucal parece ser más adecuada para la administración sostenida de agentes terapéuticos utilizando sistemas mucoadhesivos debido a la presencia de una superficie lisa y relativamente inmóvil para la colocación de una forma de dosificación mucoadhesiva. También se ha demostrado que los extractos naturales contienen compuestos muy diversos, lo que lleva al descubrimiento de compuestos con aplicaciones médicas, particularmente en el tratamiento del dolor. Conclusiones: Con la bioadhesión se busca que el medicamento permanezca por más tiempo en la aplicación para que sea eficaz y permitir su absorción en la mucosa, implementando una biopelícula bioadhesiva con extractos vegetales con propiedades analgésicas para su posible aplicación en Odontopediatría.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se han estudiado mecanismos que permiten la sustentividad de los principios activos en el sitio de la aplicación, Bioadhesión es el término que se ha empleado durante los últimos años para describir la capacidad que tienen ciertas macromoléculas ya sea de origen sintético o biológico para poder tener la capacidad de adherirse a los tejidos del organismo. Estos sistemas bioadhesivos han sido de gran utilidad en el área de la salud, específicamente para ciertas aplicaciones odontológicas y ortopédicas, así mismo para su uso en el campo quirúrgico y oftalmológico. En cirugía se ha utilizado para la liberación controlada y localizada de principios activos sobre las mucosas, ya que tienen la capacidad de adherirse a tejidos naturales o biológicos. Para esto se presentan interrelaciones entre agrupaciones químicas (polímeros) y los tejidos naturales. Con el sistema de bioadhesión se busca que el medicamento pueda permanecer por más tiempo en el sitio de la aplicación y así aumentar su efectividad y optimizar su absorción a través de la mucosa. Dichas sustancias se pueden utilizar como sistemas de liberación prolongada o bien de tipo controlada de la sustancia activa.

La bioadhesión describe la unión de un sistema de fármacos a una zona biológica específica, por ejemplo, el tejido epitelial. Si la zona biológica es una capa de moco, el fenómeno se conoce como mucoadhesión. Este concepto de "mucoadhesión" se implementó en el campo de los sistemas de liberación controlada de fármacos a principios del 1980. La mucoadhesión es la unión que tiene el fármaco junto con un portador adecuado para la membrana mucosa, es un fenómeno complejo ya que implica una buena humectación, absorción e interpenetración de cadenas de polímeros. Se considera polímero autoadhesivo ideal aquel que tiene las siguientes características (Vinod et al. 2012) Debe ser cargado sustancialmente por su compuesto activo, aumentar su volumen en el ambiente biológico acuoso del sitio de su absorción, interactuar con el moco o sus componentes para una adhesión adecuada, permitir la liberación controlada del compuesto activo cuando, excretarse sin degradar o alterar biológicamente a oligómeros no tóxicos inactivos, poseer

cantidades suficientes de grupos químicos con enlaces de hidrógeno, con alto peso molecular y alta flexibilidad de la cadena con tensión superficial que pueda ayudar a inducir la propagación a la capa mucosa.

SISTEMAS BIOADHESIVOS

La bioadhesión se denomina la interacción entre dos materiales (al menos uno de los cuales es un sustrato biológico) durante un período establecido a través de fuerzas interfaciales, con la consiguiente disminución de la energía superficial del sistema (Peppas y Buri., 2015)

Si el sustrato es una capa mucosa, se define como mucoadhesión para la interacción interesante que se produce en la interfaz entre una forma de dosificación farmacéutica y las biomembranas. (Agarwal, 2015)

Los sistemas de administración bucal mucoadhesiva han ganado mucha atención en los últimos años ya que la membrana mucosa oral es más permeable y así proporciona una mayor penetración de los activos farmacéuticos en la circulación sistémica. La administración en la mucosa bucal se considera una de las mejores alternativas para la vía oral, ya que soluciona la mayoría de los problemas asociados con la terapia oral. El medicamento que es transportado a través de la mucosa bucal llega a los capilares sanguíneos, ejerce actividad farmacológica y evita el efecto de primer paso (Nair et al., 2020)

Los sistemas mucoadhesivos tienen un gran potencial en el sitio de aplicación ya que pueden proporcionar una liberación controlada y sostenida del fármaco, disminuyendo así el número de administraciones y aumentando beneficios para el paciente. Los polímeros mucoadhesivos son generalmente macromoléculas que se caracterizan por numerosos residuos hidrofílicos que tienen la capacidad de unir glicoproteínas y formar hidrocoloides.

El moco está constituido principalmente por agua (hasta 95% en peso), sales inorgánicas (aproximadamente 1% en peso), carbohidratos y lípidos (menos del 1%) y glicoproteínas (no más del 5% en peso). Las glicoproteínas mucosas también se denominan mucinas y emplean un núcleo de proteína con cadenas de oligosacáridos ramificadas unidas en más del 63% de su longitud. Aproximadamente el 80% en peso de la glicoproteína consiste en oligosacáridos, que hacen que la mucina pueda ser más hidrosoluble y puedan proteger el núcleo de la proteína de la degradación proteolítica.

Las mucinas son las encargadas de las propiedades gelatinosas de la mucosidad. Las concentraciones de glicoproteína establecen la cohesión del moco. Cuando se logra una concentración crítica de mucina, los volúmenes hidrodinámicos de las moléculas empiezan a superponerse y se forma lo que llamamos gel (Serra et al., 2009)

En la aplicación farmacéutica, su uso ayuda a la biodisponibilidad, absorción y administración de fármacos, al tiempo que disminuye sus efectos secundarios. Se considera un polímero ideal a aquel que cumpla con las siguientes características (1) retener de una manera fácil los fármacos hidrófilos y lipófilos, y que su liberación no se dificulte, (2) formar preferiblemente enlaces no covalentes con mucina, (3) inhibir la acción de las enzimas locales y ayudar la absorción del fármaco, (4) adherirse lo más rápido posible para los tejidos biológicos, (5) sean atóxicos y (6) sean de bajo costo. (Montenegro y Morales, 2017)

Los polímeros mucoadhesivos pueden considerarse como moléculas naturales o sintéticas, pueden tener diferentes cargas superficiales y pueden dividirse como polímeros convencionales (primera generación) o material nuevo (segunda generación) (Roy et al., 2009).

Los polímeros de la primera generación se pueden clasificar en tres categorías: compuestos catiónicos, aniónicos y no iónicos. Se componen de moléculas hidrófilas que contienen grupos polares funcionales, es decir, hidroxilo, carboxilo y amina, que pueden formar enlaces de hidrógeno. El quitosano, la celulosa, el carbómero, el alginato y sus derivados pertenecen a esta clase (JD, 2005).

Los hidrogeles son materiales poliméricos que tienen la característica de poseer una red tridimensional que puede retener una gran cantidad de agua o fluido biológico en condiciones fisiológicas; pueden utilizarse como sistemas de entrega por las propiedades únicas de la conversión sol-gel que es modulada por un estímulo biológico específico. (Giuliano et al, 2018).

Biopelículas bioadhesivas

Los sistemas bioadhesivos se han utilizado en el área de la salud, específicamente para ciertas aplicaciones odontológicas y ortopédicas, así mismo también para el uso en el campo quirúrgico y oftalmológico. En cirugía se usa para la liberación controlada y localizada de principios activos sobre las mucosas, ya que cualquier material puede poseer la capacidad de adherirse a tejidos naturales o biológicos. Para esto se presentan interrelaciones entre agrupaciones químicas (polímeros) y los tejidos naturales. (Rodríguez et al., 2010)

Los sistemas de administración de fármacos han constituido plataformas prometedoras para la incorporación de agentes fotosensibilizante. Entre ellos encontramos los hidrogeles que ocupan una posición destacada. Estas son redes poliméricas tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua mientras permanecen insolubles debido a las interconexiones entre las cadenas poliméricas individuales.

Los hidrogeles termosensibles se han investigado como sistemas que facilitan la administración de fármacos en la mucosa, debido a su acción no irritante en las biomembranas y a las opciones que ofrecen para administrar medicamentos a un compartimento específico, manteniendo la concentración necesaria durante un período prolongado de tiempo, y disminuyendo la dosis eficaz y los efectos secundarios (Mayol et al., 2011).

Los hidrogeles poliméricos son redes poliméricas 3D hidrofílicas que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua de una manera similar a los tejidos corporales. Esta propiedad facilita que los hidrogeles encapsulen moléculas terapéuticas y las protejan de la degradación rápida, transformándolas en materiales útiles para fines farmacéuticos y médicos. Otra característica importante de muchos hidrogeles poliméricos es su capacidad para liberar moléculas terapéuticas atrapadas de una manera bien controlada. (Grijalvo et al., 2016)

El quitosano es un polisacárido con un lineal de alto peso molecular natural. Se deriva de la quitina, el componente estructural principal de los exoesqueletos de artrópodos (incluidos los crustáceos e insectos), las diatomeas y las algas marinas, y también permite la resistencia mecánica de algunas paredes celulares fúngicas (Raafat y Georg Sahl, 2009).

Debido a sus propiedades de bioadhesión y permeabilidad, es apto para formar un hidrogel que puede utilizarse como un sistema de liberación de fármacos para uso tópico u oral, considerándolo un buen candidato como agente liberador de antibióticos y fotosensibilizadores. Este material se ha usado como agente bioadhesivo y permeable, lo que ayuda su aplicación para la administración de fármacos siendo considerado como un reductor de antibióticos para la reducción bacteriana en aplicaciones orales (Fontana et al., 2018).

Además de ser una opción favorable para el sistema local de administración de fármacos, la acción antimicrobiana del quitosano en sí mismo puede aumentar el efecto bactericida de la terapia (Liu et al., 2014).

Películas comestibles

Desde los años 70's, los polímeros petroquímicos, han sido el material más extensamente utilizado para embalar debido a su alto rendimiento y su bajo precio.

Las películas comestibles se les conoce como una o varias capas delgadas de un material que puede ser consumido por los seres vivos y que a su vez pueden actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos de alimentos.

Extractos vegetales

Las plantas medicinales han sido una importante base para el tratamiento medicinal a lo largo de la historia humana, y tales medicinas tradicionales todavía se emplean de una manera amplia hoy en día, donde muchas personas en todo el mundo están apoyándose a estos productos para el tratamiento de diversos problemas de salud en diferentes entornos de atención médica (Dikhoba et al., 2019). Las plantas medicinales presentan una amplia variedad de fitoquímicos que se dice que tienen importantes actividades antimicrobianas y antimicóticas (Sharma et al., 2016). Se considera que alrededor del 80% de las personas en los países en desarrollo utilizan medicamentos tradicionales para su atención médica (Palombo, 2011). Los humanos han buscado alternativas para

curar diversas enfermedades desde la antigüedad; incluso actualmente. Estos usos han beneficiado el campo de la medicina herbal y también han ampliado su credibilidad. La batalla contra la resistencia a múltiples fármacos ha resultado en la mayor pérdida para la economía mundial. Los antibióticos han jugado un papel importante en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, los usos inadecuados de los antibióticos han resultado en la problemática de resistencia a los antimicrobianos. En efecto existe un mayor interés en las plantas medicinales ya que 30-50% de los productos farmacéuticos actuales son derivados de plantas. (Herrera et al., 2019).

La salud oral es una parte integral de la salud general. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) A diferencia de las infecciones en otras partes del cuerpo, las infecciones orales son polimicrobianas ya que ejercen al mismo tiempo su patógeno y dificultar su tratamiento.

El campo de la odontología también ha empezado a beneficiarse con las propiedades herbales con el fin de eliminar el dolor de dientes, la inflamación de las encías y las aftas. Los antisépticos, antibacterianos, antimicrobianos, antimicóticos, antioxidantes, antivirales y analgésicos derivados de plantas son de gran uso en odontología.

PARTE EXPERIMENTAL

Se procedió a la elaboración de una biopelícula bioadhesiva a base de mucilago de linaza. Primeramente, utilizamos 210 gramos de linaza, Se colocó 700 ml H₂O añadiéndole la linaza, Se puso en agitación durante 2 horas a 600 rpm adicionándole una barra magnética. Se realizó la extracción del mucilago, al concluir las 2 horas de agitación, se realizó la extracción del mucilago. Se agregó alcohol etílico C₂H₅OH, agregando el doble de la cantidad obtenida de mucilago y se retiraron excesos de alcohol, Fig. 1. Se obtuvo la muestra, se dejó secar durante 2 horas.



Fig. 1 Procedimiento experimental empleado, para la obtención de biopelícula.

RESULTADOS

Se logró obtener una muestra, para producción de películas delgadas y homogéneas a base de linaza, con propiedades óptimas, cumpliendo con el proceso de secado, que es una etapa importante en la formulación de películas. Los parámetros principales que influyen en el secado son el tiempo y la temperatura, influyendo en la cristalinidad y propiedades mecánicas de la película, Fig 2.

Fig. 2. Muestra para la obtención de biopelícula.



CONCLUSIONES

los recubrimientos comestibles proporcionan una cubierta protectora, representando una alternativa en la cavidad oral ya que se ha comprobado que prolongan la vida de los alimentos y se evita que se deterioren rápidamente por la presencia del oxígeno del aire, la absorción o pérdida de humedad, el ataque de microorganismos.

BIBLIOGRAFIA

1. Shweta Agarwal, Shikha Aggarwal. "Mucoadhesive Polymeric Platform for Drug Delivery"; A Comprehensive Review Current Drug Delivery 2015;12(2)
2. Lin CC¹, Metters AT. "Hydrogels in controlled release formulations": network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;58(12-13):1379-408
3. Cindy Cruz Martínez, Martha Díaz Gómez, and Myung Sook Oh. "Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry": a review *Pharm Biol.* 2017; 55(1)
4. Fontana C.R., dos Santos Junior D.S., Bosco J.M., Spolidorio D.M., Chierici Marcantonio R.A. "Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery." *Drug Deliv.* 2008;15:417-422.
5. P.M. Dikhoba, N.I. Mongalo,* E.E. Elgorashi, and T.J. Makhafola " Antifungal and antimycotoxigenic activity of selected South African medicinal plants species *Heliyon*". 2019 ; 5(10)
6. Elena Giuliano,¹ Donatella Paolino,² Massimo Fresta,¹ and Donato Cosco^{1,*} "Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels": An Overview *Pharmaceutics.* 2018 Sep; 10(3):
7. Santiago Grijalvo,^{ab} Judith Mayr,^c Ramon Eritja^{ab} and David Díaz Díaz. "Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications convenience" *Biomater* 2016;4:555-5
8. Jacobo-Herrera N ,Anand U, Altemimi A, Lakhssassi N-A "Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery.*Metabolites*". 2019;9(11).
9. Smart JD¹. "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion". *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):
10. Hui Liu Yumin Du Xiaohui Wang Liping Sun "Chitosan kills bacteria through cell membrane damage" *Int J Food Microbiol.* 2014 95(2):147-55.

11. Laura Mayol^{*} Marco Biondi Fabiana Quaglia Sabato Fusco Assunta Borzacchiello[§] Luigi Ambrosio[§] Maria I. "La Rotonda Injectable Thermally Responsive Mucoadhesive Gel for Sustained Protein Delivery Biomacromoléculas " 2011; 12 (1): 28-33
12. Miguel Montenegro-Nicolini & Javier O. Morales "Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics" AAPS PharmSciTech 2017;18
13. Anroop B. Nair,^a Bandar E. Al-Dhubiab,^{a,*} Jigar Shah,^b Shery Jacob,^c Vismay Saraiya,^b Mahesh Attimarad,^a Nagaraja SreeHarsha,^a Sabah H. Akrawi,^a and Tamer M. Shehata^{a,d} Mucoadhesive buccal film of almotriptan improved therapeutic delivery in rabbit model Saudi Pharm J. 2020 Feb; 28(2): 201–209.
14. Enzo A. Palombo Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases Evid Based Complement Alternat Med. 2011;(3)
15. Nikolaos A. Peppas ,Pierre A. Buri Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. Journal of Controlled Release, 2015;2, 257–275.
16. Dina Raafat * y Hans - Georg Sahl Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. Microb Biotechnol. 2009;2(2):186-201
17. Rodríguez I., Cerezo A., Salem I., Bioadhesive release systems, Ars Pharmaceutical, 2010;(1)
18. S. Roy,K. Pal,A. Anis,K. Pramanik &B. Prabhakar Polymers in Mucoadhesive Drug-Delivery Systems: A Brief Note Designed Monomers and Polymers 2009;12(6)
19. Mukut Seal, Rahul Rishi, G. Satish, K. T. Divya, Pratim Talukdar, and Radhika Maniyar Herbal panacea: The need for today in dentistry J Int Soc Prev Community Dent. 2016; 6(2): 105–109.
20. Laura Serra,^{a,b,c} Josep Doménech,^c and Nicholas Peppas^{a,b,d,*} Engineering Design and Molecular Dynamics of Mucoadhesive Drug Delivery Systems as Targeting Agents Eur J Pharm Biopharm. 2009 M71(3): 519–528.
21. Shveta Sharma, Jagmohan Sharma , Gurpreet Kaur Therapeutic uses of Elettaria cardomum INTERNATIONAL JOURNAL OF DRUG FORMULATION AND RESEARCH 2016;(2)
22. Sidhu P , Shankargouda S , Rath A , Hesarghatta Ramamurthy P , Fernández B , Kumar Singh A Therapeutic benefits of liquorice in dentistry. J Ayurveda Integr Med. 2018;(17) 30510-7
23. Sophia Zougagh, Ayoub Belghiti, Tarik Rochd,² Ilham Zerdani,¹ and Jamal Mouslim¹ Medicinal and Aromatic Plants Used in Traditional Treatment of the Oral Pathology: 2019; 9(1): 35–48

POTENCIAL ANTI-LISTERIA MONOCYTOGENES DE PROBIÓTICOS

María Porfiria Barrón González, Yadira Quiñones Gutiérrez, Jorge Luis Menchaca Arredondo y
Ramón Gerardo Rodríguez Garza

Universidad Autónoma de Nuevo León
maria.barrongn@uanl.edu.mx

RESUMEN

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva contaminante de gran variedad de alimentos a nivel mundial, ya que además de soportar un pH y temperaturas muy variables, es una bacteria cosmopolita que se puede encontrar y aislar prácticamente de cualquier sustrato o superficie, además es el agente causante de una de las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) más importantes, es decir, la listeriosis; a la cual se le atribuye una tasa considerable de mortalidad, también este agente ha sido foco de gran interés por generar resistencia a gran variedad de antibióticos y evadir el sistema inmunológico de los seres humanos que una vez infectados es necesaria la combinación de diversos fármacos para erradicarla. Por lo cual, lo más recomendable es buscar una manera de evitar contraer listeriosis, es decir evitando que el agente causal (*L. monocytogenes*) nos infecte, y dado que se necesita un inóculo muy pequeño para contraer la infección, la alternativa más eficaz es evitando que esta bacteria se instale en el organismo. En la actualidad las bacterias lácticas han tomado gran importancia debido al gran beneficio que ellas proporcionan a la salud. Estas bacterias, entre las cuales se encuentran los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* son los géneros más utilizados en humanos. Se han utilizado como probióticos debido a que son seguras, producen bacteriocinas, ácido láctico, ácido acético y peróxidos, los cuales pueden ser responsables de la inhibición del crecimiento de diversos organismos, como lo es en el caso de *L. monocytogenes*. En este trabajo se evaluaron diversas concentraciones de liofilizados de factores extracelulares (LFE) de *Lactobacillus* y posteriormente fueron analizadas las alteraciones al microscopio de fuerza atómica, en los resultados obtenidos se logra apreciar los cambios morfológicos, fisiológicos y estructurales que sufrió la bacteria de estudio *L. monocytogenes* al haberla sometido a las diferentes tratamientos, en este caso a los tipos de liofilizados de los factores extracelulares provenientes de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium longum* y no se observa diferencia significativa en el porcentaje de inhibición entre los liofilizados de factores extracelulares analizados sobre el crecimiento *in vitro* de *L. monocytogenes* con respecto a la droga ceftriaxona. Es recomendable continuar con el estudio de los metabolitos producidos por las bacterias probióticas *L. casei* y *B. longum* en búsqueda de elucidar el mecanismo de acción frente a microorganismos patógenos como lo es *L. monocytogenes* y que dichos tratamientos presenten el menor impacto negativo sobre los pacientes y el ambiente.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes: se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos sólo se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos contaminados (1). Hoy en día, *Listeria monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria (2). *L. monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo, responsable de la mayor parte de las infecciones por *Listeria* que afectan al hombre. Aunque *L. monocytogenes* posee un potencial zoonótico evidente, también es un importante contaminante medioambiental. Se han identificado diversos determinantes moleculares de virulencia que juegan un papel en la infección celular por *L. monocytogenes*, estos determinantes de virulencia comprenden, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O, la proteína Act A, dos fosfolipasas, una metaloproteasa y una hidrolasa de sales biliares (3).

Las causas de la problemática de esta enfermedad son diversas y se atribuyen principalmente al hecho de que existe mucha desinformación, además de que los síntomas que produce la listeriosis suelen asociarse a otros padecimientos y al ser el agente causal una bacteria intracelular, también perjudica los exámenes de diagnóstico por lo que ya cuando se detecta la enfermedad ya existe una repercusión considerable. Afecta considerablemente a mujeres embarazadas provocando abortos o enfermedades del SNC en el feto y en el caso de niños, adultos mayores y personas inmunodeprimidas, meningitis, cerebritis e incluso la muerte (4).

La información obtenida puede ser útil para abrir nuevas investigaciones dirigidas primordialmente a los factores extracelulares y cómo es que estos podrían ser utilizados para mejorar la calidad de vida de los seres humanos ya que esencialmente se utilizan los probióticos como tal en alimentos o suplementos alimenticios, sin embargo estos podrían volverse perjudiciales en individuos inmunodeprimidos o con padecimientos gastrointestinales, caso contrario al uso de los factores extracelulares.

TEORÍA

La listeriosis es una infección grave causada por consumir alimentos contaminados con *L. monocytogenes*, la cual recientemente ha sido reconocida como un serio problema de salud pública en los Estados Unidos mientras que en México, las fallas en los sistemas de vigilancia epidemiológicos son causa de información imprecisa sobre la incidencia de la listeriosis y sobre su caracterización como ETA. La enfermedad afecta principalmente a personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos que tienen el sistema inmunitario debilitado. Sin embargo, también puede afectar a las personas que no presentan estos factores de riesgo (4).

La tasa de mortalidad de la listeriosis depende de qué tan avanzado esté la infección por *L. monocytogenes* que suele causar meningitis, la tasa de mortalidad global puede ser tan alta como 70% mientras que en mayo las tasas de septicemia alcanzan hasta el 50%, y para perinatal/neonatal las tasas de infecciones podrá superar el 80% (5). Si la infección ocurre durante el embarazo, los antibióticos que se administran de manera inmediata a madres embarazadas por lo general pueden prevenir las infecciones del feto o del recién nacido. Los bebés con listeriosis reciben los mismos antibióticos que los adultos, aunque a menudo se utiliza una combinación de antibióticos hasta que los médicos estén seguros del diagnóstico. Incluso con un tratamiento inmediato, algunas infecciones causan la muerte en personas edad avanzada o con otros problemas de salud (4).

En este trabajo se eligió a la ceftriaxona como control negativo debido a su eficacia sobre *L. monocytogenes*, sin embargo también se tomó en cuenta el realizar un bioensayo con nisina ya que *L. monocytogenes* es una bacteria que se contrae por consumo de alimentos contaminados, y la nisina además de conservador se utiliza para inhibir el crecimiento de Gram negativas sobre los alimentos, por lo que se tomó en cuenta el rol de esta bacteria en el ámbito clínico tanto como en el alimenticio.

Probióticos: Se define probiótico a todo microorganismo vivo, cuya ingestión en cierto número confiere beneficios a la salud más allá de sus beneficios nutricionales inherentes (Barrantes, 2004). Las bacterias deben cumplir con ciertos requisitos para poder ser consideradas probióticos por ejemplo, deben resistir la acidez del estómago y las sales biliares, fijarse en el epitelio intestinal y colonizar el intestino, además deben ser capaces de competir con otras bacterias o sus productos tóxicos y aniquilarlos mediante cambios de pH intestinal o por la producción de proteínas antibacterianas llamadas bacteriocinas (6)

Probióticos y su importancia clínica:

Los probióticos son ampliamente recomendables para modular la microbiota intestinal y mejorar la salud a través de múltiples mecanismos de acción, incluyendo la inhibición directa de los patógenos entéricos por la disminución del pH luminal, la secreción de proteínas bactericidas y la estimulación de la defensina por las células epiteliales (6). Estudios actuales demuestran que la administración oral de lactobacilos específicos estimulan la inmunidad y mejorar la resistencia a los tumores e infecciones. Algunos probióticos tienen el potencial de reducir la severidad de condiciones de

enfermedad que van desde las enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de crohn y colitis ulcerosa (7).

La organización de las naciones unidad para la agricultura y la alimentación (8) y la organización mundial de la salud indican que se ha probado científicamente la eficacia de los llamados alimentos probióticos. También indica que para que se relacionen con efectos benéficos para la salud deben contener géneros de bacterias que sean seguras para el consumo humano, como lo son *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium longum*.

Lactobacillus casei es una bacteria gram-positiva que se encuentra formando la microbiota de intestino y boca de los humanos así como en otros animales. Esta bacteria, productora de ácido láctico, se emplea en la industria láctea en la elaboración de alimentos probióticos. Es un microorganismo beneficioso, ayuda a promover otras bacterias y evita el crecimiento de bacterias patogénicas en el cuerpo humano. Específicamente, promueve el crecimiento de la bacteria *L. acidophilus* (9). *Bifidobacterium longum* es un género de bacterias gram-positivas anaeróbicas, no móviles y con frecuencia ramificadas. Las bifidobacterias son uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la microbiota intestinal y es considerada una de las bacterias probióticas más importantes en el cuerpo humano. Es una de las bacterias saludables más prevalentes en el tracto intestinal de los lactantes alimentados con leche materna. Se coloniza principalmente en el tracto gastrointestinal inferior y en el colon (10).

Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

El microscopio de fuerza atómica (MFA) se basa en la creación de imágenes digitalizadas mediante la medición de las fuerzas repulsivas y atractivas entre átomos de una punta y los átomos de la superficie (11). El MFA utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir. El AFM es un instrumento ampliamente utilizado en el área biológica y biomédica por permitir el análisis topográfico y mecánico de material biológico vivo como lo es el caso de las bacterias, este microscopio tal y como ya se mencionó cuenta con diferentes modos de operación y la selección del método adecuado depende en gran parte de las propiedades de la muestra que se vaya a procesar, entre los modos de operación destacamos los siguientes: a) Modo Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre la superficie. b) Modo Tapping: También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente la superficie y c) Modo No Contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y de la punta (12).

La microscopía de fuerza atómica por su potencial de lograr resolución molecular y atómica lo han colocado en una posición fundamental para el análisis de la materia a escala nanométrica, sin el problema de preparación de material que debe colocarse en un ambiente de vacío, como lo es en el caso del microscopio electrónico. Sus aplicaciones en el área biológica, principalmente se ha utilizado en el análisis de moléculas aisladas y procesos moleculares *in vitro* (13). La principal ventaja del AFM es la posibilidad de visualización de células vivas *in situ*, lo que hace que sea una técnica potente y útil para el estudio de células bacterianas (14). La introducción del microscopio de fuerza atómica en estudios microbiológicos ha ayudado a los investigadores con un nuevo dispositivo para el análisis de la morfología bacteriana. Las características morfológicas específicas de la pared celular bacteriana podrían ser útiles en la identificación de factores específicos. Hasta el momento este método no se ha utilizado para estudiar las características morfológicas de *L. monocytogenes* (15).

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

- Listeria monocytogenes* (ATCC 15313)
- Lactobacillus casei* (ATCC 334)
- Bifidobacterium longum* (ATCC15707)

Probióticos

- Medio de cultivo para probióticos, se prepara de acuerdo con lo reportado (16)

- Obtención de liofilizados factores extracelulares de probióticos (lfep): se realizó de acuerdo con lo reportado (17).
- Preparación de la solución madre de probióticos: Se pesan 2g del liofilizado LFEP y se disuelven bajo condiciones de esterilidad en 10mL de medio MPT pH 7.0, se esteriliza empleando un filtro Millipore 0.22 μ m, se somete a prueba de esterilidad durante 24h a 37°C. Una vez que la prueba de esterilidad resulta positiva (es decir, que no se presenta turbidez) la solución madre se almacena a 4°C hasta su uso. A partir de esta solución madre se obtienen concentraciones de 0.1, 5, 10, 15 y 20mg/mL.

Listeria monocytogenes

- Mantenimiento: A partir de una cepa que se mantiene en refrigeración a 4°C, se hacen resiembras sucesivas en tubos de 13 x 100 mm de borosilicato con tapón de rosca, que contenían 4mL de MPT-Caldo a los cuales se les inocula con 30 μ L de la cepa, enseguida se incuban a 37°C por 24h.
- Cinética de crecimiento: Se dispone de 10 tubos de borosilicato de 13 x 100 mm con tapón de rosca, los cuales contienen 4mL de MPT-Caldo, se inoculan con 30 μ L de *L. monocytogenes*, la cual previamente se reactivó por tres resiembras consecutivas con el mismo volumen de inóculo, enseguida se incuban a 37°C y cada hora se realizan las lecturas de absorbancia a 635nm durante un lapso de 14h aproximadamente, se registra y grafica cada lectura.
- Análisis al afm: Para la obtención de micrografías y la caracterización nanomecánica de las muestras de *L. monocytogenes* se utilizó un microscopio de Fuerza Atómica modelo NTEGRA PRIMA, marca NT-MDT, el microscopio será operado en el modo contacto intermitente. Para la preparación de la muestra es necesario tomarla de una colonia aislada mediante el uso de un asa bacteriológica en un ambiente de esterilidad, se coloca sobre una gota de agua previamente depositada sobre el portaobjetos, se extiende y se deja secar para su fijación y análisis. El AFM fue operado por el especialista de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Determinación del volumen. Considerando que la imagen obtenida a través del análisis al AFM consta de puntos discretos de los cuales conocemos largo, ancho y altura podemos modelar cada punto como una columna rectangular de la cual se obtiene un volumen; sumando el volumen de cada una de estas columnas se puede aproximar el volumen de la célula.
- Análisis estadísticos: Para determinar *in vitro* el efecto del liofilizado de medio condicionado de cada probiótico sobre el cultivo de *L. monocytogenes*, los bioensayos se realizaron mediante tres eventos independientes por triplicado, los resultados se analizaron mediante el Análisis de varianza con un $P < 0.05$ empleando el paquete estadístico SPSS 21 para Mac.

Bioensayo

Los bioensayos se realizaron de acuerdo con la Tabla I, se utilizaron tubos de 13x100mm, cada uno conteniendo 5 mL del medio MPT y tratados según la estrategia experimental, enseguida todos los tubos se incubaron a 37°C por 5h, inmediatamente se tomaron lecturas al espectrofotómetro a 635 nm (Spectronic-Genesys5®) de cada tratamiento y posteriormente se realizaron los análisis de los datos. Cada bioensayo se realizó en tres eventos independientes por triplicado.

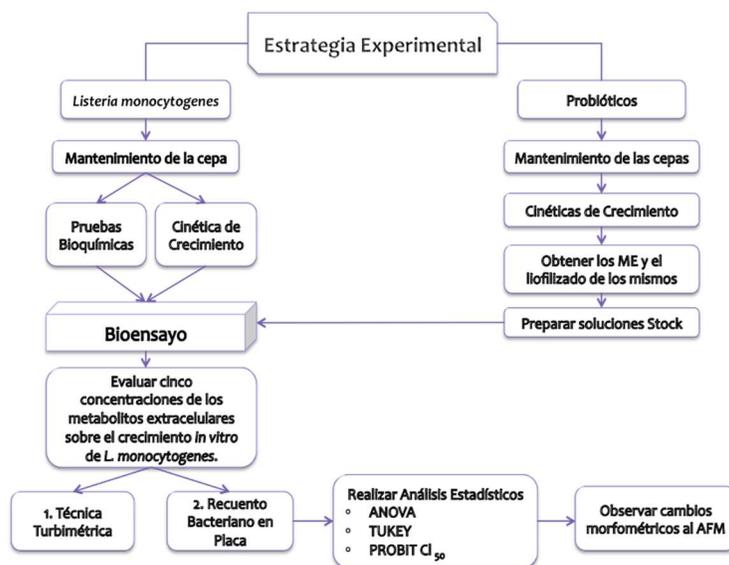


Figura 1.- Estrategia experimental para la evaluación *in vitro* de LFEP sobre *L. monocytogenes*.

RESULTADOS

BIOENSAYO: En la Figura 2 se observa el concentrado de los resultados correspondientes a los valores de absorbancia obtenidos en el bioensayo, en los cuales se realizó la comparación de la actividad biológica de los liofilizados de factores extracelulares (LFE) de probióticos (*L. casei* y *B. longum*) a una concentración de 10mg/mL, los cuales mostraron una diferencia significativa respecto al control positivo más no entre ellos, la inhibición por parte de los LFE de probióticos representa el 36%, estas lecturas se obtuvieron a la sexta hora del incubación de *L. monocytogenes* de la cual se determinó por medio de una cinética de crecimiento que este era el punto óptimo de la bacteria donde contaba con sus mejores propiedades fisiológicas y metabólicas, en cuanto al control negativo se obtuvo una absorbancia de 0.0262nm lo cual representa una inhibición del 93%.

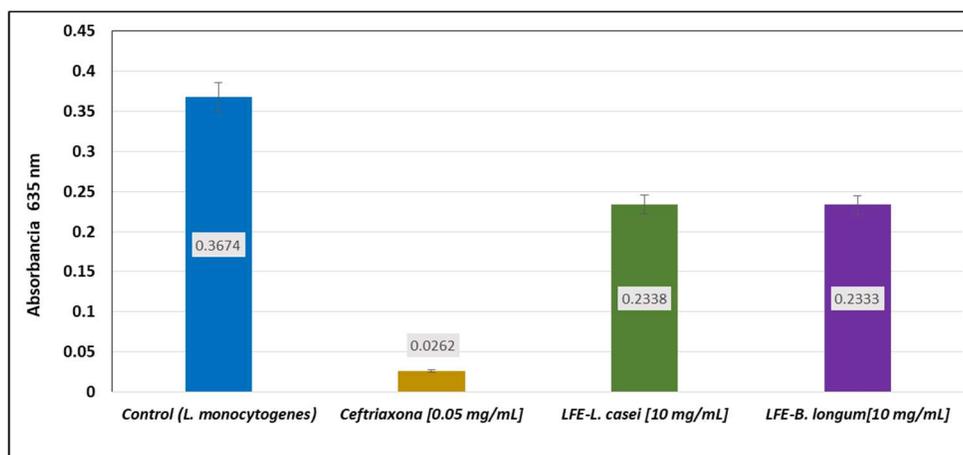


Figura 2. Análisis comparativo de la actividad biológica de los LFEP y ceftriaxona sobre el crecimiento *in vitro* de *L. monocytogenes*.

En la figura 3 se ilustra el recuento bacteriano en placa (RBP) obtenido durante el bioensayo en el cual podemos ver de color verde el control positivo de *L. monocytogenes* en condiciones óptimas de cultivo, la siguiente columna es el control negativo donde se cultivó *L. monocytogenes*+ ceftriaxona la cual sólo se recuperaron 8 UFC/mL (barra azul), finalmente encontramos a *L. monocytogenes*

cultivada en presencia de LFE-*L. casei* en la cual sólo se recuperaron 93UFC/mL (barra naranja), en la barra morada se muestran las 264 UFC/mL recuperadas de *L. monocytogenes* al ser cultivada en presencia del LFE-*B. longum*.

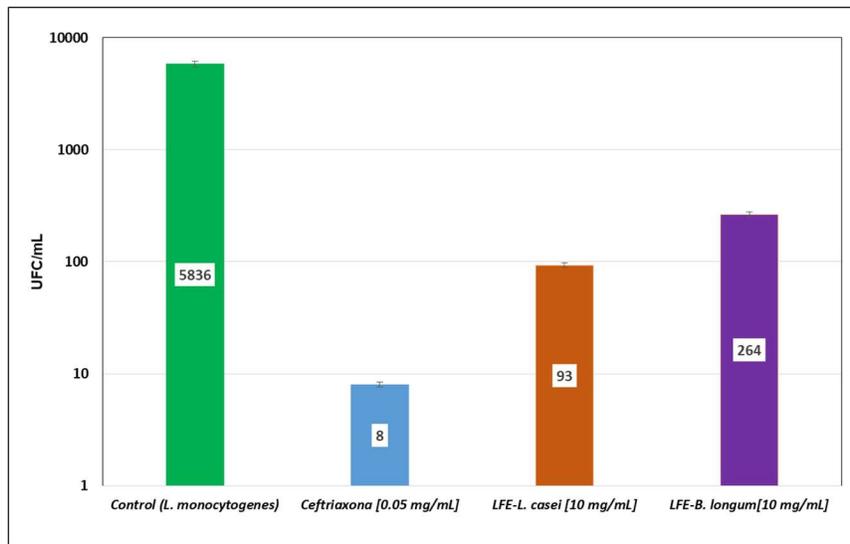


Figura 3. Comparación de UFC/mL de LFE-*L. casei* y LFE-*B. longum* obtenidas en el bioensayo *in vitro* de *L. monocytogenes*.

En la figura 4 se muestra la comparación entre los porcentajes de inhibición de *L. monocytogenes* en presencia de tres tratamientos: ceftriaxona (barra roja) inhibió 99.87%, mientras que los porcentajes de inhibición de los LFE-*L. casei* y LFE-*B. longum* no mostraron diferencia significativa con respecto a esta droga ni entre ellos, observándose una inhibición de 96.69 y 95.47% respectivamente.

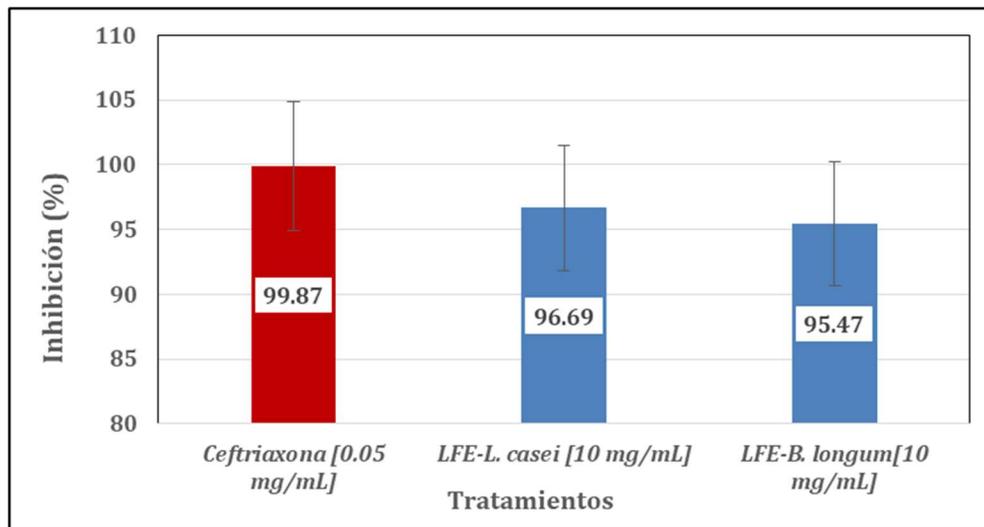


Figura 4- Comparación de la inhibición de los LFE de *L. casei*, *B. longum* y la droga ceftriaxona sobre el crecimiento *in vitro* de *L. monocytogenes*.

Análisis morfométrico de *L. monocytogenes* al AFM: En la figura 5 se muestran las imágenes correspondientes a la observación al microscopio de fuerza atómica de una preparación en fresco de *L. monocytogenes* incubada durante 7 horas en cultivo MPT, cuando la bacteria se encontraba a

la mitad de su fase logarítmica. En (a) se muestra la micrografía correspondiente *L. monocytogenes* ésta micrografía corresponde a un área de 80µm de longitud y 1.6µm, el fondo se observa más oscuro y las zonas blancas corresponde a material de mayor altura, en b) se muestra la morfología de *L. monocytogenes* después de ser tratada con ceftriaxona y en c) se muestra *L. monocytogenes* después de ser tratada con LFE de *L. casei*. Los valores del análisis morfométrico de altura, largo, ancho y volumen se muestran en la Tabla 1.

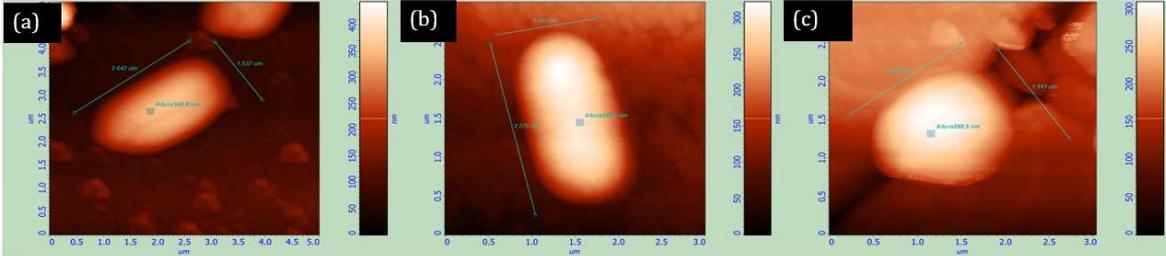


Figura 5- Comparación del aspecto de *L. monocytogenes* al MFA a) control, b) cultivada en presencia de ceftriaxona y c) cultivada en presencia de LFE-*L. casei*.

En la Tabla 1, se muestra el promedio de altura de *L. monocytogenes* obtenido por cada tratamiento, donde se observa una altura mayor en el control positivo (370.8nm), mientras que esta se redujo en el control negativo y en el tratamiento con LFE-*L.casei* de manera similar con valores de 302.9 y 297.7nm respectivamente, es decir cerca de 70nm menos que el control positivo. Se observa marcada diferencia significativa entre los valores de altura de los tratamientos con respecto al control, sin embargo entre tratamientos no se observa diferencia significativa (Figura 6).

Tabla 1. Comparación morfométrica de *L. monocytogenes* al ser cultivada en presencia de ceftriaxona y LFE de *L. casei*

	<i>L. monocytogenes</i> cultivada en presencia de:		
	Control	Ceftriaxona [0.05 mg/ml]	LFE- <i>L.casei</i> (10 mg/ml)
Altura (nm)	370.8	302.9	297.7
Largo (µm)	2.51	2.21	1.95
Ancho (µm)	1.30	1.32	1.44
Volumen (µm³)	0.62	0.61	0.59

También se muestran los promedios correspondientes al largo de *L. monocytogenes* cultivada en presencia de ceftriaxona y LFE-*L.casei*, se aprecia una disminución significativa en el largo de la bacteria al ser tratada con LFE-*L.casei* en comparación al control positivo ya que este valor decrece de 2.51µm a 1.95µm al ser sometida al tratamiento y en presencia del control negativo presenta un promedio de 2.21µm. Entre los tratamientos no se encuentra diferencia significativa pero en comparación al control positivo sí presentan diferencia significativa (Figura 7).

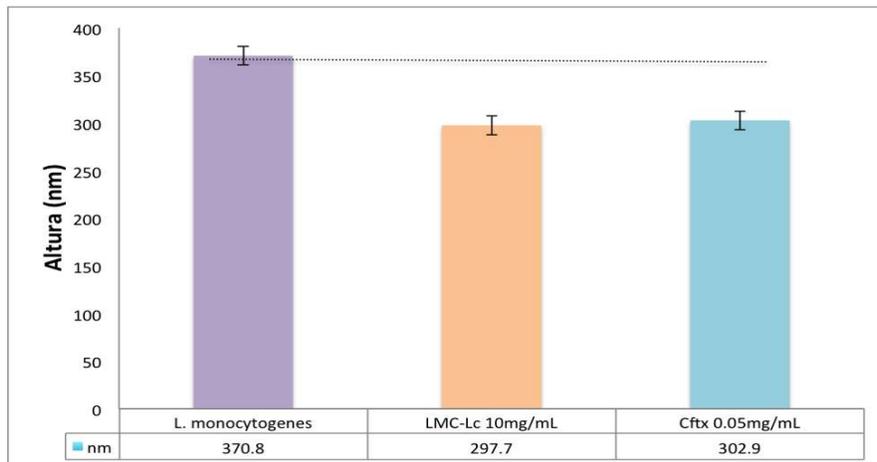


Figura 6. Comparación de la altura promedio de *L. monocytogenes* (barra morada) cultivada en presencia de ceftriaxona (barra azul) y LFE-Lc (barra naranja) obtenidas al AFM.

Se aprecia un aumento significativo en el ancho de la bacteria con tratamiento de LFE-*L. casei* con respecto a ambos controles los cuales oscilan los 1.3µm a diferencia de la bacteria tratada que en su promedio arrojó un valor de 1.44µm. El control positivo (barra morada) presenta diferencia significativa ligera con respecto al promedio obtenido en el ancho de la bacteria con tratamiento LFE-Lc (barra naranja) y en comparación al promedio del ancho de la bacteria sometida a la droga (barra azul) no presenta diferencia significativa (Figura 7). El promedio del volumen de *L. monocytogenes* cultivada bajo tres condiciones, en la barra morada se muestra el promedio del volumen de *L. monocytogenes* (control positivo), en la barra azul se aprecia a *L. monocytogenes* cultivada en presencia de ceftriaxona (control negativo), entre estos tratamientos no hay diferencia significativa pero ambos con respecto al tratamiento con LFE-*L. casei* (barra naranja) sí muestran una ligera diferencia significativa (Figura 7).

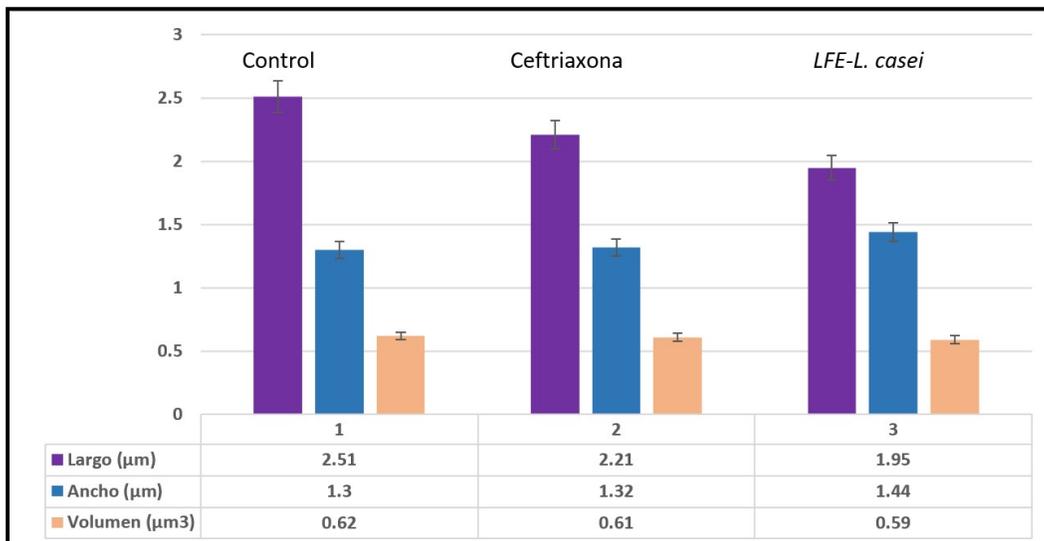


Figura 7. Comparación del promedio de altura, ancho y volumen de *L. monocytogenes* cultivada en presencia de ceftriaxona y LFE-Lc obtenidas al AFM.

CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron los Liofilizados de Factores Extracelulares (LFE) de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium longum*, estos cuatro microorganismos están incluidos en la categoría Generalmente Considerados Seguros, en inglés GRAS (Generally Regarded as Safe), por los organismos reguladores internacionales (18).

De acuerdo a los resultados obtenidos con la técnica de recuento bacteriano en placa (RBP) al emplear los dos Liofilizados de factores extracelulares (LFE) sobre el cultivo de *L. monocytogenes* podemos observar que la concentración de 10mg/mL presenta gran actividad "listericida" (ver figura 4), estos resultados nos indican que hay una marcada diferencia significativa entre los tratamientos y el control (UFC/mL de *L. monocytogenes*). De acuerdo a los porcentajes de inhibición se observa que la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* por parte de la droga de elección y los dos tratamientos no presenta diferencia significativa. Estos resultados son muy prometedores para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, estos resultados concuerdan con lo reportado previamente, quienes mencionan que *Lactobacillus* sp y *Bifidobacterium* sp, inhiben significativamente a *L. monocytogenes*, este hallazgo fue obtenido al trabajar *in vitro* en un modelo de células epiteliales (C2Bpe1) en donde obtuvieron una inhibición del 60-90% de la invasión a tejido epitelial (19). Esta inhibición puede estar ocasionada por ácidos grasos de cadena corta (acetato y lactato) que disminuyen el pH con efectos antibacterianos además de los ácidos grasos estas bacterias segregan antibióticos naturales con amplio espectro de actividad, como lactocinas, helveticinas, curvacinas, nisina y las bifidocinas.

Con base a lo reportado por otros autores (20) y de acuerdo a los resultados obtenidos (figura 4), cabría la posibilidad de diseñar nanopartículas funcionalizadas con los liofilizados de factores extracelulares de probióticos (LFEP) evaluados en este trabajo y determinar su actividad biológica sobre *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos de importancia médica y de alimentaria. Con respecto del efecto adverso de las drogas en el humano (21); en este sentido ha emitido un comunicado en el cual expresa "las anomalías congénitas puede tener origen genético, infeccioso o ambiental, aunque en la mayoría de los casos resulta difícil definir la causa".

Considerando que los liofilizados de factores extracelulares de probióticos (LFEP) pudieran ser degradados en el ambiente, representa alternativa al tratamiento convencional con drogas sintéticas. Además, las bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes* generan resistencia a la mayoría de las drogas empleadas en el mercado, mientras que la frecuencia del desarrollo de resistencia a bacteriocinas no se pueden predecir, ya que esta dependerá del estrés y las condiciones de crecimiento específicas. Sin embargo, si surgen cepas resistentes a bacteriocinas, deben esperarse a proliferar en la carne y, posiblemente, también otros alimentos sistemas (22).

Una de las herramientas microscópicas que permite observar células vivas, es el microscopio de fuerza atómica, el cual fue inventado en 1929 por Binning G. y Heinrich R. (23). Esta herramienta microscópica permite obtener de la célula vida datos como: rugosidad, elasticidad, altura, largo, ancho, volumen, adhesión, entre otros datos. Esta propiedad permite obtener datos más exactos acerca de la respuesta de célula ante una droga o algún factor de estrés. Diversos trabajos se han realizado empleando esta nueva herramienta microscópica, entre los trabajos realizados se pueden mencionar: en un estudio se evaluó el efecto de péptidos antimicrobianos de nisina en *L. monocytogenes* por medio del AFM, ellos concluyen que el uso del AFM permite detallar los mecanismos de la actividad biológica del péptido de nisina en bacterias Gram-positivas en condiciones nativas (24).

En la Tabla 1 podemos apreciar los valores promedio de *L. monocytogenes* obtenidos al AFM correspondientes al largo, alto, ancho y volumen durante el bioensayo que incluye los datos para *L. monocytogenes* en condición normal, sometida a ceftriaxona (control negativo) y LFE-Lc (Tratamiento) donde por medio de datos numéricos obtenidos se puede apreciar una diferencia detallada de *L. monocytogenes* entre los diferentes tratamientos a los que se sometió. Esta información coincide con lo establecido en un estudio realizado al AFM sobre el efecto antimicrobiano de péptidos sobre la envoltura celular de *E. coli*; ellos mencionan que por medio de este microscopio es posible distinguir los tipos de daños a la membrana externa de las células bacterianas causadas a la membrana externa por péptidos (14).

Aunque desde esta perspectiva la ceftriaxona pueda parecer un tratamiento seguro y eficaz, en realidad existen reportes que establecen que la ceftriaxona no puede ser tomada durante el embarazo y lactancia ya que representa un riesgo al barrer con la microbiota natural del organismo tanto de la madre como la del producto (25), dando paso a infecciones por microorganismos oportunistas, además también existen evidencias de eventos adversos a esta droga(26); que describen casos de hipersensibilidad a la penicilina y ceftriaxona por ser moléculas químicamente similares por lo que visto de esta manera el uso de los LFEP podría ser otro camino a seguir para combatir a *L. monocytogenes*, ya que como se muestra en la figura 4, la ceftriaxona no muestra diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de *L. monocytogenes* con respecto a los cuatro LFEP utilizados sin incluir todos los riesgos ya mencionados que conlleva el uso de la ceftriaxona por lo cual sería recomendable continuar con estudios para ver cuál es el alcance de penetración de los LFEP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S., Nicholls E.S. & Broome C.V., (1983). "Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food". *N. Engl. J. Med.*, 318:203–206.
2. Rocourt J. & Billie J., (1997). "Foodborne listeriosis." *World Health Stat Q.*, 50(1-2):67–73.
3. Dussurget O., Cabanes D., Dehoux P., Lecuit M., Buchrieser C., Glaser P. & Cossart P., (2002). "*Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a prfa-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis". *Mol. Microbiol.*, 45:1095–1106.
4. CDC, (2012). Centros para el control y prevención de enfermedades. Centro Nacional para las enfermedades infecciosas y zoonóticas. División de enfermedades transmitidas por comida agua o ambiente. Página revisada y modificada: 12 de Julio del 2012, <http://www.cdc.gov/> (Consultado el 23 de abril del 2020).
5. FDA website. 2007. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. [CjwKEAjwjQ_BRDribyJpc_mzHgSJABdnsFWcfg3U91X_byazF9xfnctKSYFzQ7z3dCHWDknzFjgHhoCWKHw_wcB](http://www.fda.gov/oc/ohrt/food/BRDribyJpc_mzHgSJABdnsFWcfg3U91X_byazF9xfnctKSYFzQ7z3dCHWDknzFjgHhoCWKHw_wcB)(Accessed august 2008).
2. Sartor R. (2004) "Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections." *Curr opin gastroenterol* 21: 44–50.
3. Gill, H.S., Rutherford, K.J., Prasad, J., Gopal, P.K., (2000). "Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019)". *Br. J. Nutr.* 83:167–176.
4. FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
5. Spanhaak S, Havernaar R.,(1998). "The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans". *Eur J Clin Nutr.* 52(12):889-907.
6. Sanchez J; (2014). "Evaluación de la biodisponibilidad oral de isoflavonas: papel de la microbiota intestinal". Tesis Doctoral, Universidad de Antioquia, Valencia España. pp.45-60.
7. Instituto de Investigación Nestlé, (2003). Probióticos y microbiota intestinal del hombre. Lausanne (Suiza). https://www.nestlenutrition-institute.org/intl/es/resources/library/Free/anales/a67_1/Documents/07%20Microbiota%20intestinal,%20obesidad%20y%20diabetes.pdf (accesada 23 de agosto de 2016).
8. González M. Y Uribe J., (2005). "Microscopio de Fuerza Atómica". Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica Zacatecas, pp. 10-13.
9. Hansma, H. G; Kim K. J; Laney D. E; (1997). "Properties of biomolecules measured from Atomic Force Microscope images: A review, *J. Struct Biol*; 119:99-108
10. Meincken M; Holroyd D. And M. Rautenbach (2005). "Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology"; Nueva York. pp.4085-4092.

11. Germano F, Bramanti E, Arcuri C, Cecchetti F, Cicciú M; (2013). "Atomic force microscopy of bacteria from periodontal subgingival biofilm". Preliminary study results. *Eur J Dent*; 7:152-158.
12. Barrón González, M. and Quiñones-Gutiérrez, Y. (2018). "Antibiosis of Cefotaxime/Clindamycin and *Lactobacillus acidophilus* Related Bacteria to Diabetic Foot Ulcer". *Food and Nutrition Sciences*, 9, 277-289. doi: [10.4236/fns.2018.94022](https://doi.org/10.4236/fns.2018.94022).
13. Barrón-González, M. P., Mireles-Rangel, C., Cuéllar-Guevara, F. L., Eguiarte-Lara, D. J., &
14. Quiñones-Gutiérrez, Y. (2019). "Inhibición de *Enterobacter cloacae* por *Bifidobacterium longum*". *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 19-26.
15. Corr SC., Cormac G.M. y Colin Hill., (2007). "Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response". 50(3): 380 – 388.
16. Tormo C. R. (2006). "Probióticos. Concepto y mecanismos de acción". *An Pediatr* 2006; 4(1):30-41.
17. Zohri, M., Alavidjeh, M.S., Haririan, I. Ardestani M.S., Sadat Ebrahimi S.E., Sani H., Seyed Kazem Sadjadi S.K., (2010). "Probiotics & Antimicro. Prot". 2: 258. doi:10.1007/s12602-010-9047-2
18. World Health Organization. Foodborne disease-possibly 350 times more frequent than reported. WHO Geneva, 1997. http://www.who.int/tdr/publications/documents/seb_topic3.pdf (accesado 27 agosto 2016).
19. Gravesen A., Axelsen J. A. M., Méndez D.S.J., Hansen T. B., Knochel S., (2002). "Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*". *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2):756-764.
20. Reséndiz, M.C., & Castrellón, J. (2005). "Microscopio de Fuerza Atómica" Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica (pp. 1-6). Zacatecas, México.
21. Valyshev AV, Vasil'chenko AS. (2013). "Study of features of the effect of cationic antimicrobial peptide nisin on *Listeria monocytogenes* bacteria by using atomic-force microscopy". *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (5):8-13.
22. Wendel, GD., JS Sheffield, LM Hollier, JB Hill, PS Ramsey, PJ. Sanchez., (2002). "Treatment of Syphilis in Pregnancy and Prevention of Congenital Syphilis". *Clinical Infectious Diseases* . 35(2):S200–9
23. Nicholls PJ., (1980). "Neurotoxicity of penicillins". *J Antimicrob Chemother*; 6:161-72.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE REDUCCIÓN EN EL TAMAÑO FINAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE NIQUEL SOPORTADAS EN ZEOLITA ZSM-5 CON RELACIÓN Si/Al:40

Nayely Metzín Montoya Hernández, Karina V. Chavez, y Víctor M. Soto.

Laboratorio del Estado Sólido, Departamento de Química, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1421, esq Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México. naye_mh1225@live.com.mx , vittoriomx@yahoo.com

RESUMEN

Se define una nanopartícula como aquella partícula cuyo diámetro cae dentro del intervalo 1nm - 100nm. Aunque esta es una definición generalizada es la que se ha aceptado hasta ahora. Este tipo de partículas presentan comportamientos muy distintos al del material en bulto, ya sea químicos, ópticos, térmicos, según sea el caso. En este trabajo pretendemos sintetizar nanopartículas de níquel soportadas en Zeolita ZSM-5, en función de la temperatura de reducción usada. Las zeolitas son materiales estructurados que están formados de silicio, aluminio y oxígeno. Se introducen cationes de níquel, mediante intercambio iónico, y después se someten a reducción mediante flujo de hidrógeno. Las temperaturas de reducción a usar van desde 100 a 500°C. De esta manera pretendemos correlacionar el tamaño final de las nanopartículas dependiendo de la temperatura de reducción usada. La metodología consiste en intercambiar iónicamente muestras de 250 mg de Zeolita ZSM-5 con relación Si/Al:40 en una solución 6.5902×10^{-3} M en $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ durante setenta y dos horas. El níquel intercambiado fue calculado mediante titulación volumétrica dando un promedio de intercambio de 1.8176×10^{-5} mol Ni / g zeolita. Se llevaron a cabo las reducciones mediante flujo de un cm^3 de hidrógeno gas a 25°C, durante dos horas a 100, 200, 300, 400 y 500°C. Las muestras fueron analizadas mediante UV-vis de reflectancia difusa obteniendo los espectros de absorbancia. Dichos espectros fueron analizados haciendo deconvolución de los mismos mediante curvas Gaussianas. Los resultados arrojaron una tendencia clara que nos indicaba que mientras la temperatura de reducción era alta (400, 500°C), la población de partículas grandes de níquel aumentaba y se convertían en mayoría. Mientras que a temperaturas bajas (100, 200°C), la gran mayoría estaba representada por las partículas pequeñas. Esto nos da pauta a elegir la temperatura adecuada de reducción para obtener un tamaño de nanopartícula adecuado a un propósito. Esta es una investigación de química básica, que nos permite afinar los parámetros a usar para obtener nanopartículas uniformes. La temperatura de 100°C, nos produce la gran mayoría de nanopartículas pequeñas. Aun cuando es una temperatura inferior a la recomendada en la literatura (300°C para plata y en general), en este caso particular de nanopartículas de Níquel, los 100 grados toman una importancia relevante. Y nos da pie a futuras investigaciones.

INTRODUCCION

Una nanopartícula se define cómo aquella partícula cuyo diámetro cae dentro del intervalo de uno a cien nanómetros. Esta es una definición generalizada, una manera de acotar un problema. En este caso, el problema sería el hablar del mundo de la nanociencia. Este mundo se ha descrito como un gran conjunto de trabajos que se desarrollan a nivel atómico o molecular dentro del famoso intervalo de uno a cien nanómetros. Se habla de la fabricación de dispositivos y sistemas con nuevas propiedades, debidas completamente a su tamaño [1]. Un punto sumamente importante que se menciona, es el hecho de que el tamaño tan pequeño de las nanopartículas provoca que exhiban propiedades físico-químicas muy diferentes a las del mismo material en bulto. Sin embargo hay que hacer notar algo de suma importancia. Cuando hablamos de un nanomaterial no solo deberá hacerse referencia a su tamaño, sino que también se deberá considerar su estructura. Es decir debe estar estructurado cristalinamente y además tener un tamaño de entre uno y cien nanómetros, para que este dentro del conjunto de los nanomateriales. Uno de los tópicos mas interesantes en la síntesis de nanopartículas es conseguir que estas sean sintetizadas de manera tal que presenten un tamaño uniforme. Es decir que presenten monodispersidad. O al menos que el tamaño sea controlable [2]. Las ventajas de conseguir un tamaño uniforme se reflejan precisamente en las propiedades del

material. Ya sea que este material sea soportado, o como parte de un nanocompósito, lo cual proporciona grandes posibilidades en la fabricación de dispositivos.

TEORIA

Una manera sencilla de fabricar nanopartículas metálicas es a partir del método de intercambio iónico. Éste método consiste en poner en contacto un catión metálico de una solución generalmente acuosa, con una matriz intercambiante. Esta matriz puede ser perfectamente una zeolita. Las zeolitas son sólidos cristalinos compuestos de silicio, aluminio y oxígeno. La estructura está dispuesta en forma de tetraedros en los que los vértices están ocupados por átomos de oxígeno y en el centro de cada vértice se encuentra ubicado un silicio o un aluminio. Cuando el lugar del centro está ocupado por un aluminio, se genera un desbalance de cargas, dando como resultado un sitio con carga negativa. Este sitio con carga negativa atrae cationes tales como el sodio, el hidrógeno y el amonio entre otros. Estos cationes se unen al sitio con carga negativa mediante fuerzas de Coulomb, pero no forman un enlace químico. Todos los tetraedros se unen por los vértices, y en cada sitio de aluminio habrá un catión unido a él, pero susceptible a ser removido por otro catión. Esta movilidad potencial de los cationes es la causa de las propiedades intercambiadoras de las zeolitas.

Existen más de 300 tipos de zeolitas, todas con las características químicas ya mencionadas pero con una gran variedad de formas estructurales [3]. Muchas de las zeolitas más útiles son sintéticas. En este trabajo la zeolita usada es la, ZSM-5, la cual es una zeolita sintética, con cationes intercambiables de amonio (NH_4)⁺. Una vez que se lleva a cabo el intercambio catiónico, la zeolita con los cationes de metal intercambiados se somete a un proceso de reducción a una temperatura que ronda desde los 200°C, a 300°C y en algunos casos hasta 500°C [4,5].

La estructura de la zeolita ZSM-5, genera canales y cavidades en la siguiente figura podemos apreciar un dibujo de la estructura de esta zeolita, que posee una celda unitaria ortorrómbica con parámetros de red, $a = 20.1 \text{ \AA}$, $b = 19.7 \text{ \AA}$, $c = 13.1 \text{ \AA}$. Las figuras muestran a la estructura vista a lo largo de la dirección $[0 1 0]$.

Esta estructura forma canales y cavidades. Como se puede apreciar en las siguientes figuras:



En la figura "A", tenemos la sección de uno de los canales que existen en la estructura de la zeolita ZSM-5 visto desde la dirección $[1 0 0]$, las dimensiones de los diámetros observadas son de 5.5Å y 5.1Å. En la figura "B", tenemos la sección del mismo canal de 10 átomos, que existen en la estructura de la zeolita ZSM-5, pero ahora visto desde la dirección $[0 1 0]$, por lo que las dimensiones propuestas de los diámetros observadas son de 5.3Å y 5.6Å.

El proceso de reducción es muy importante para obtener un tamaño final de las nanopartículas que se pretende sintetizar. La variable más significativa de la reducción, es la temperatura. La temperatura está asociada a la velocidad de las partículas gaseosas en un sistema, y a la vibración de una red. En este caso, cuando un catión metálico sufre reducción se convierte en un átomo de metal, aislado. Esto se debe a que ya no está "ligado" a la estructura con la que estaba unido mediante fuerzas de atracción electrostática. Al perder su carga por el proceso de reducción, entonces ya no tiene la fuerza de atracción. Pasa a ser una partícula libre, tal cual como es la definición de gases. Aquí es donde la temperatura tiene un papel predominante, ya que a mayor temperatura, mayor movilidad. A menor temperatura menor movilidad.

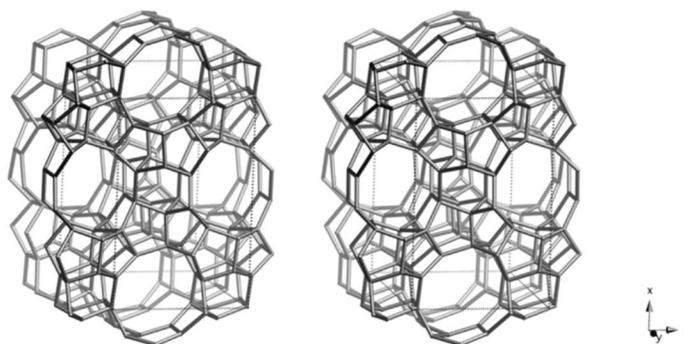
Los átomos metálicos tienden a agruparse, formando nanopartículas. Una vez que están libres, se desplazan en la matriz zeolítica hasta encontrarse con otra partícula metálica y entonces estabilizarse ahí. Esta es la manera en que se forman los cúmulos metálicos, las nanopartícula y las

partículas. Como se señaló, la temperatura es el parámetro que promoverá la formación de unos u otros.

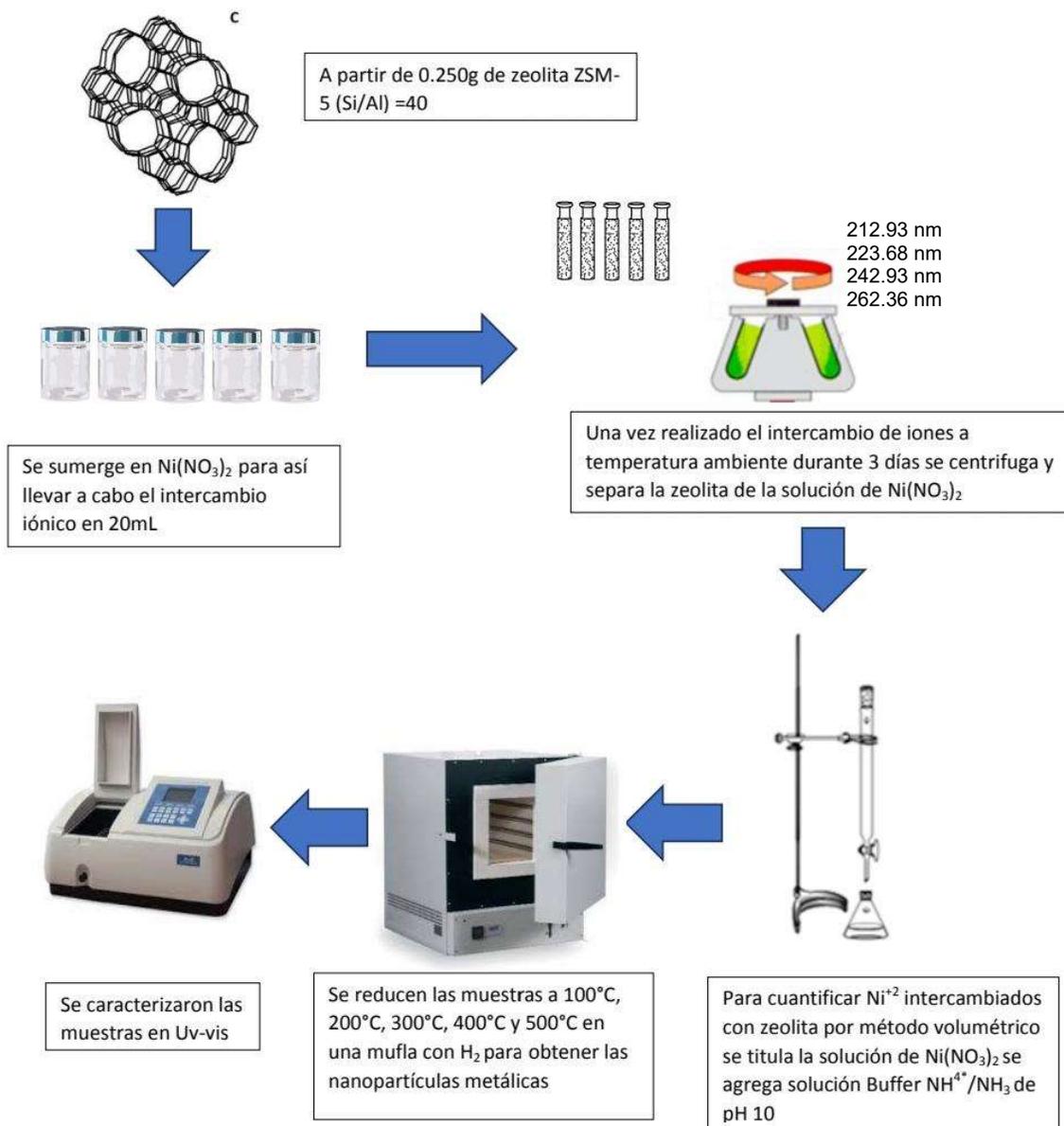
Las nanopartículas metálicas pueden ser caracterizadas mediante la espectroscopia UV-vis de reflectancia difusa. Este método nos da la ventaja de que es un método en bulto, y de esta manera podemos tener una idea de la distribución de tamaños. Se asocia a absorciones de longitud de onda menores (hacia 200 nm), la presencia de nanopartículas pequeñas. Mientras que la tendencia a absorber a longitudes de onda mayores (hacia 800 nm), se suele asociar a nanopartículas grandes o partículas de más de 300 nm de diámetro [4].

PARTE EXPERIMENTAL

En este trabajo, usamos la zeolita sintética ZSM-5, obtenida de la firma, *Zeolyst International*, con relación silicio / aluminio, igual a 40 (CBV-8014), Nitrato de Níquel, *Alfa Aesar* 99.99%, agua deionizada. y un aparato UV-vis de reflectancia difusa, de la firma Agilent Technologies, Carey Serie 300. Una mufla NOVATECH modelo MD-12 de hasta 900°C. Gas hidrogeno de la firma PRAXAIR, grado cromatográfico.



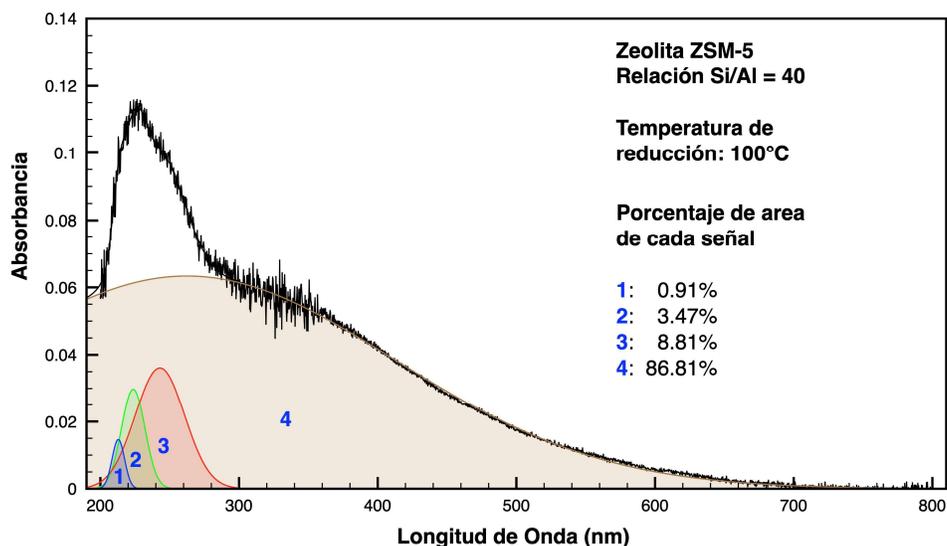
Esquema



RESULTADOS

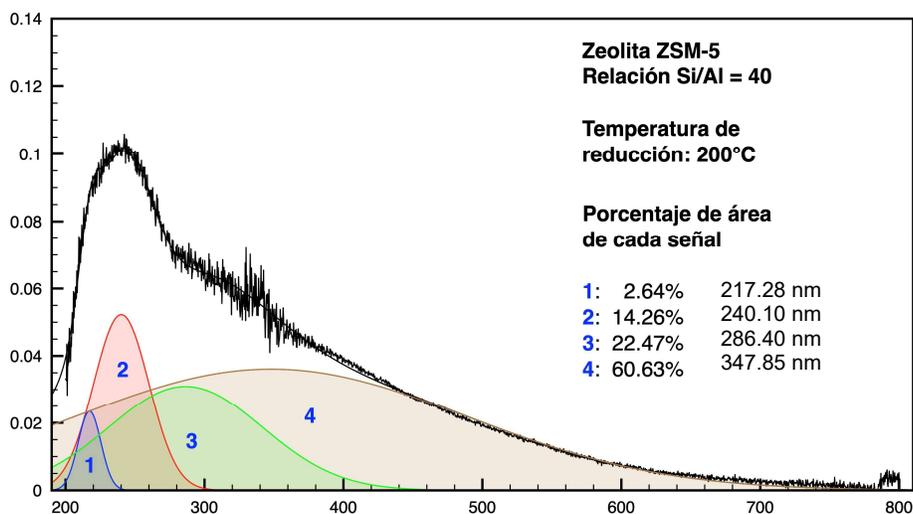
Los espectros obtenidos de la técnica UV-vis e reflectancia difusa muestran la absorbancia de cada una de las diferentes muestras reducidas a 100°C, 200°C, 300°C, 400°C y 500°C. Esta técnica en si misma presenta pequeñas variaciones en el nivel de absorbancia. Por lo que se procedió a obtener las señales generadas mediante curvas Gausianas y de esta manera se calculó el porcentaje de composición usando la proporción de área de cada curva Gausiana componente.

Para la muestra reducida a 100°C tenemos:



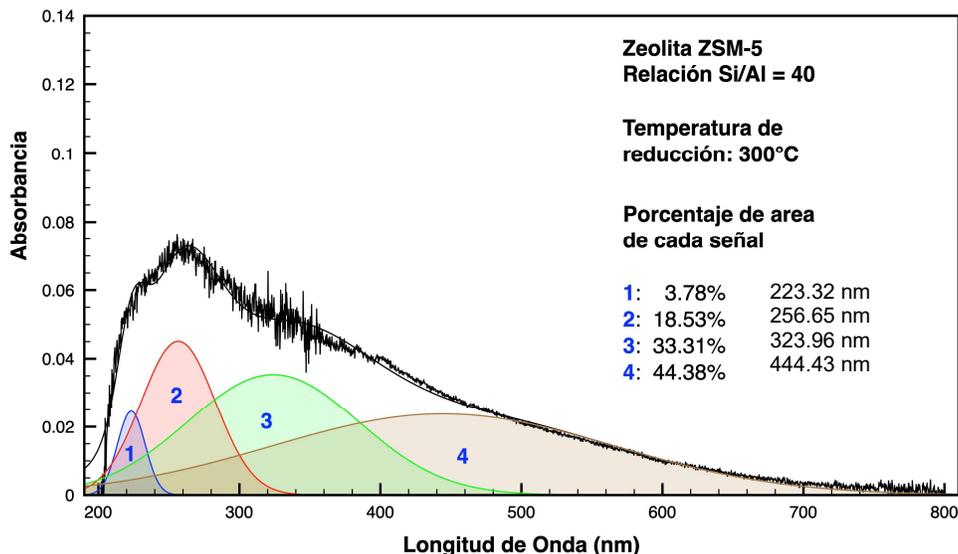
Se observan tres picos (1,2,3) muy bien definidos que se pueden asociar a nanopartículas de níquel. El área representada por 4, que es una área muy amplia se puede considerar que más bien es parte del fondo del espectro.

Para la muestra reducida a 200°C tenemos:



En este espectro se presenta un incremento de área en el pico 2, y un ensanchamiento en el pico 3. Al parecer el pico 4 sigue mas bien siendo parte del fondo del espectro.

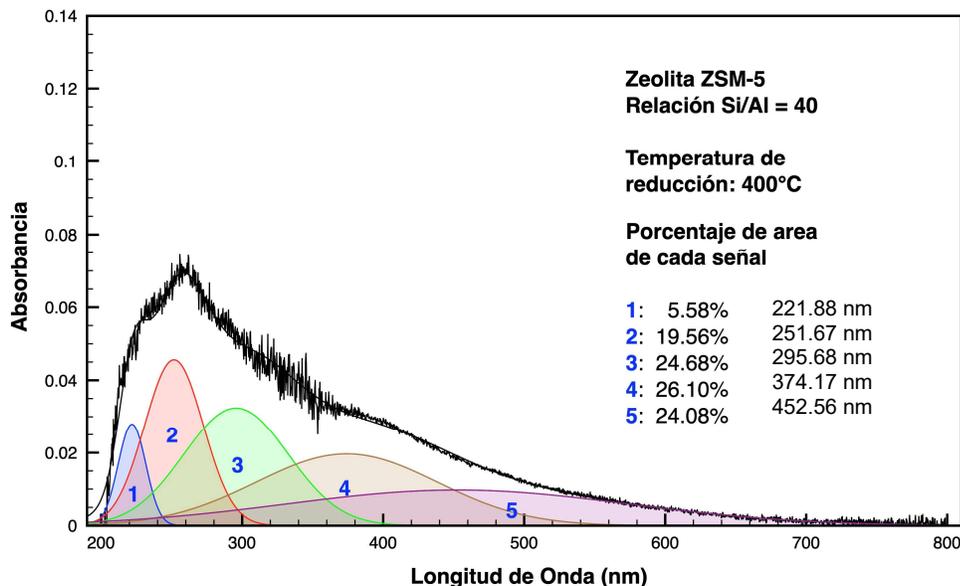
Para la muestra reducida a 300°C tenemos:



El espectro correspondiente a la muestra reducida a 300°C, nos muestra los mismos tres picos bien definidos pero ahora con áreas relativas de 3.78%, 18.53% y 33.31% respectivamente. Algo que sí comparamos con los valores a 200°C, teníamos, para el mismo orden, 2.64%, 14.26% y 22.47%. Esto no nos proporciona mayor información por lo que para tener un mejor criterio procedamos como sigue: Se calculan los porcentajes de área sin considerar el fondo. De esta manera estamos trabajando con los picos que están asociados a nanopartículas exclusivamente. los porcentajes de área sin considerar el fondo son:

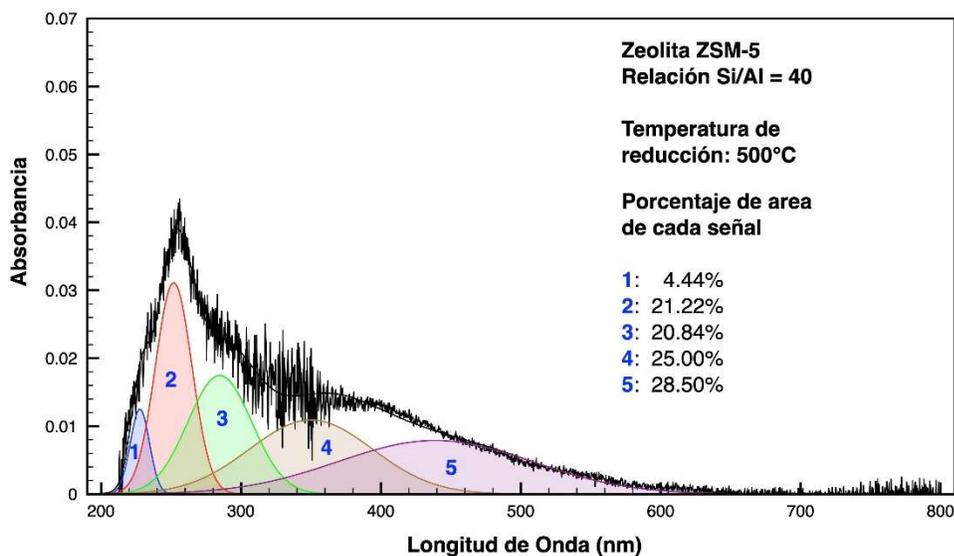
PICO	Temperatura 200°C	Temperatura 300°C
1	6.71%	6.8%
2	36.22%	33.31%
3	57.07%	59.89%

Como podemos ver el área del pico 1 quedó prácticamente invariable. Pero el área del pico dos bajó en 2.9 puntos porcentuales y la del pico 3 subió en 2.8 puntos porcentuales. Es decir hubo un ligero cambio hacia las partículas de mayor tamaño.



Para la muestra reducida a 400°C tenemos un cambio significativo. El espectro se analizó y la única manera de obtener una deconvolución bien hecha fue con la aparición de un quinto pico. Quizá este pico implica la generación de partículas más grandes. Ya que si observamos el pico 4, este se encuentra en la posición 374.17 nm, por lo que no lo podemos asociar al anterior pico 4 (444.43 nm). Si no que más bien este pico 4, representa la aparición de nanopartículas de tamaño mayor. Justamente esto sucede en la temperatura de 400°C. Esta temperatura marca una diferencia en el comportamiento que observábamos en los espectros hasta los 300°C de reducción.

Para la muestra reducida a 500°C tenemos:



Observamos un reacomodo en los picos, pero prácticamente vienen siendo los mismos con cambios pequeños en las áreas. Podemos decir entonces que a las temperaturas de 400°C y 500°C, se observan los mismos picos con ligeros cambios en posición y área. Si consideramos que para las nanopartículas pequeñas, hablamos de una posición de hasta 270 nanómetros de longitud de onda [4], es factible ver la tendencia de crecimiento en el tamaño de las partículas conforme se incrementa la temperatura.

Esta técnica de UV-vis de reflectancia difusa es una técnica adecuada, ya que a pesar de que muestra cambios en la absorbancia conforme las muestras fueron sintetizadas a mayor temperatura, se puede trabajar con ellas haciendo el cálculo de las áreas relativas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten decir que el aumento de temperatura promueve el aumento de tamaño en las nanopartículas sintetizadas en la zeolita ZSM-5 con relación Si/ Al = 40, a partir del intercambio iónico de la zeolita con una solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. El camino seguido por las muestras a las diferentes temperaturas, nos indican un ligero incremento en las nanopartículas pequeñas, pero más bien lo que sucede es su conversión a partículas mayores por migración. Si podemos hablar de una temperatura importante, es la de 400°C, ya que a partir de esa temperatura aparece un quinto pico y la cantidad de partículas y nanopartículas grandes se incrementa considerablemente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kenneth J. Klabunde, Ryan M. Richards "Nanoscale materials in chemistry", J. Wiley & Sons, 2nd Edition, 2009.
2. V. S. Gurin, V. P. Petranovskii, N. E. Bogdanchikova, "Metal clusters and nanoparticles assembled in zeolites: an example of stable materials with controllable particle size", Materials Science and Engineering C. Vol 19, 2002, pp. 327- 331.
3. Ch. Baerlocher, L. B. McCusker, D. H. Olson "Atlas of zeolite framework types" Published on behalf of the structure commission of the international zeolite association. Sixth revised edition, 2007. ELSEVIER
4. Nina E. Bogdanchikova, Vitalii P. Petranovskii, Roberto Machorro, Yoshihiro Sugi, Víctor Soto, Sergio Fuentes "Stability of silver clusters in nordestes with different $\text{SiO}_2 / \text{Al}_2\text{O}_3$ molar ratio", Applied surface science. Vol 150, 1999, pp. 58-64.
5. V. S. Gurin, N. E. Bogdanchikova, V.P. Petranovskii, "Self-assembling of silver and copper small clusters within the zeolite cavities: prediction of geometry", Materials Science and Engineering C, Vol 18, 2001, pp. 37-44.

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *ELETTARIA CARDAMOMUM* Y *CITRUS PARADISI* CONTRA *CANDIDA ALBICANS*

Ileana Stefanía Trejo Loa¹, Rosa María Sánchez Casas², Uziel Castillo Velázquez³, María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda⁴, Jorge Jesús Rodríguez Rojas⁵, Abelardo Chávez Montes⁶, Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis⁴.

Universidad Autónoma De Nuevo León

¹Facultad de Odontología, Posgrado de Odontopediatría, ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, ⁴Facultad de Odontología, ⁵CIDICS, ⁶Facultad de Ciencias Biológicas.
trejoileana@gmail.com

RESUMEN

Los términos candidiasis y candidosis son sinónimos del proceso de la enfermedad que regularmente se asocia con *Candida albicans*. Se estima que entre el 30 y el 60% de los adultos sanos portan especies de *Candida* dentro de la cavidad oral. La Organización Mundial de la Salud describe a las plantas medicinales como una alternativa en el tratamiento de enfermedades. Dentro de las plantas de importancia se encuentra el *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi*, ya que ambas poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, entre otras. Analizar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi* contra *Cándida Albicans* (ATCC). Se realizó la obtención de los extractos de *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi* por la técnica de maceración en frío, se utilizó 52.45g de *Elettaria cardamomum* 100ml de etanol y 82.8g de *Citrus Paradisi* con 400ml de etanol se dejaron en reposo 72 horas y posteriormente se filtró y se midió el rendimiento. Con una muestra de cada extracto se realizó el análisis fitoquímico siguiendo el protocolo de Domínguez (1973) para identificar de manera parcial los principales grupos químicos presentes en los extractos. Se analizó el efecto antifúngico de los extractos contra *C. albicans* mediante la técnica de antibiograma por triplicado y se evaluó la sensibilidad a las 24 horas, comparandose con los controles, clorhexidina al 2% como positivo y etanol como negativo. Se obtuvo un extracto sin presencia de grumos en condiciones óptimas para su análisis, el extracto de *Elettaria cardamomum* obtuvo reacción positiva en la presencia de esteroides, triterpenos, flavonoides, flavanonas, flavanoles, quinonas, taninos, al igual que el extracto de *Citrus Paradisi*. Ambos extractos presentaron efecto antifúngico contra *C. albicans* (ATCC). Los extractos de *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi* presentaron efecto antifúngico favorable contra el principal comensal causante de la candidiasis oral por lo que, se sugiere dar continuidad a su análisis, que permita sugerir su posible aplicación en el tratamiento de la candidiasis oral.

Palabras claves: Candidiasis oral, *Elettaria cardamomum*, *Citrus Paradisi*, *Cándida albicans*.

INTRODUCCIÓN

La importancia de la búsqueda de nuevas alternativas naturales de tratamientos contra enfermedades bucodentales causadas por microorganismos fúngicos se debe a la resistencia a medicamentos por el uso generalizado, irracional y crónico de ellos y es por eso una de las razones del desarrollo de resistencia a los medicamentos azoles (Lakshmi,2018).

La candidiasis oral es una enfermedad micótica común que se encuentra en la dermatología, más comúnmente causada por un crecimiento excesivo de *Candida albicans* en la boca (Jillian,2016). Para el tratamiento de infecciones causadas por "*Cándida Albicans*" se ha venido utilizando regularmente medicamentos como la "Nistatina, fluconazol y el ketoconazol", por lo que afirma que este hongo ha mostrado resistencia a estos medicamentos (Chamba, 2015).

Las especies se han convertido en un importante patógeno nosocomial con aumento en aislamientos resistentes a fármacos. La identificación del nivel de especie es esencial ya que ciertas especies como *Candida krusei* son inherentemente resistentes al azol (Jayachandran, 2018).

La Organización Mundial de la Salud describe a las plantas medicinales como una alternativa en el tratamiento de enfermedades. Dentro de las plantas de importancia se encuentra el *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi*, ya que ambas poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, entre otras.

Es importante conocer que existen alternativas naturales para el tratamiento de la candidiasis debido a la resistencia que presenta actualmente la sociedad contra los azoles y el uso irracional que le dan. El objetivo es comparar y evaluar información de evidencia científica como revistas de alto impacto sobre las alternativas naturales de tratamiento de la candidiasis oral.

Infecciones micóticas

La incidencia mundial de infecciones fúngicas parece estar aumentando (Lockhart, 2019). Las infecciones micóticas son un problema emergente en todo el mundo con candidiasis invasiva y candidemia responsables de la mayoría de los casos. Se debe principalmente a la adopción generalizada de terapia inmunosupresora agresiva entre cierto tipo de poblaciones de pacientes por ejemplo con quimioterapia, trasplantes, etc. y al aumento del uso de dispositivos invasivos como los catéteres venosos centrales (CVC). El uso de nuevos fármacos inmunomodificadores también abre un espectro completamente nuevo de pacientes en riesgo de sufrir infecciones micóticas. Si bien la epidemiología de las infecciones por *Candida* ha cambiado en la última década, con un cambio gradual de *C. albicans* a cepas de *Candida* no *albicans* (NAC) que suelen ser menos susceptibles a los azoles, los cambios varían entre hospitales y regiones dependiendo del tipo de factores de riesgo de la población y el uso de antimicóticos (Enoch, 2017)

Una evidencia cada vez mayor muestra que diferentes efectos sobre el sistema inmune podrían estar asociados con un mayor riesgo de infecciones (Puerta, 2018)

Las infecciones por hongos son de gran preocupación en odontología. Los pacientes pueden presentar infecciones que pueden ser superficiales o indicativo de una enfermedad sistémica más grave.

La infección fúngica oral más común experimentada en odontología es la candidiasis oral, que se revisa en profundidad desde infecciones orales simples hasta candidiasis invasiva (Telles, 2017).

Candidiasis oral

Los términos candidiasis y candidosis son sinónimos del proceso de la enfermedad comúnmente asociado con *Candida albicans*. Se necesitaron aproximadamente 200 años antes de que el agente etiológico de la candidiasis se identificara correctamente como un patógeno fúngico (Taissa, 2020)

La mayoría de las especies dentro del género son levaduras dimórficas y forman hifas o pseudohifas junto con formas estándar de levadura blastospora. (Hellstein, 2019). Si bien *Candida albicans* es, con mucho, la especie más común asociada con aftas, al menos otras siete especies del género *Candida* se han atribuido a la enfermedad en la cavidad oral: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. tropicalis* (Sing, 2014).

Se estima que entre el 30 y el 60% de los adultos sanos portan especies de *Candida* dentro de la cavidad oral (Hellstein, 2019) La principal característica biológica de *C. albicans* con importantes implicaciones clínicas reside en su capacidad para formar biopelículas (Wall, 2019)

Comunmente abarca infecciones de la lengua y otros sitios de la mucosa oral y se caracteriza por el crecimiento excesivo de hongos y la invasión de tejidos superficiales (Millsop, 2016)

Esta infección ocurre en poblaciones de mayor riesgo, como los recién nacidos, cuyas defensas del huésped aún no se han desarrollado. En un recién nacido, generalmente la transmisión puede ser de un trabajador de salud o de la madre. Debido a que no tiene inmunodeficiencias innatas, puede producirse aftas orales en los primeros meses de vida. Además de los recién nacidos, la candidiasis oral aumentó a principios de la década de 1980 debido a la progresión del virus de inmunodeficiencia humana / síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH / SIDA) (Telles, 2016). El principio básico del manejo de la candidosis es identificar y eliminar cualquier factor de predisposición del huésped subyacente (Lewis, 2017).

Tratamiento

El fluconazol y el itraconazol son los dos agentes antifúngicos azoles sistémicos comúnmente recetados. Estos medicamentos también están asociados con interacciones medicamentosas graves y fatales, pero su menor afinidad por los citocromos humanos P450 (CYP) los hace más seguros que el ketoconazol (Hellstein, 2019)

El miconazol se ha usado comúnmente en el tratamiento de la candidiasis oral. Sin embargo, los pacientes de edad avanzada tienen tendencia a desarrollar candidiasis oral repetidamente. Por lo tanto, es fundamental tomar medidas para prevenir la recurrencia. Se ha recomendado uso de una crema hidratante oral que contiene hinokitiol, una sustancia antifúngica, de forma regular, para ayudar a prevenir la recurrencia de la candidiasis oral (Sakaguchi, 2017). La dosis de la nistatina en adultos y niños: se debe realizar colutorios de suspensión de 100000 U/ml 4 veces/día, como mínimo se debe seguir con el tratamiento durante 2 días después de que hayan desaparecido los síntomas (Chamba, 2015)

Sin embargo el uso generalizado, irracional y crónico de estos medicamentos es una de las razones para el desarrollo de resistencia a los medicamentos azoles (Lakshmi, 2018).

Uso de la herbolaria

La evolución de los sistemas de defensa de microorganismos ha conducido a búsquedas intensivas de nuevos medicamentos extraídos de varios productos naturales para combatir infecciones microbianas.

Las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre. También, han sido utilizadas en el campo de la preservación del patrimonio cultural. Bastaría citar que los primeros intentos de combatir insectos dañinos a los bienes culturales, hace más de 2300 años, fueron con aceites obtenidos de plantas pero posteriormente y con el surgimiento y desarrollo de la industria química estas fueron desplazadas.

No obstante, hoy se aprecia un fuerte interés por la utilización de sustancias naturales para prevenir y controlar el biodeterioro básicamente por los daños que los productos químicos provocan al medio ambiente, al soporte que los recibe y al personal que los aplica (Figueiredo, 1997).

Se estima que en el mundo existen de 200.000 a 250.000 especies de plantas agrupadas en 300 familias y 10.500 géneros. Datos de la OMS, revelan que el 80% de la población mundial utiliza la medicina popular (principalmente a través del uso de plantas medicinales) para sus necesidades de asistencia médica primaria.

En los últimos años, las plantas han sido fuentes muy importantes de productos naturales biológicamente activos. Un 25% de los medicamentos actuales tienen extractos de plantas en su composición, muchos de ellos utilizados inicialmente como materia prima para lo que luego serán drogas semisintéticas como el taxol, de uso en el tratamiento del cáncer (Al-Sohaibani, 2011).

Elettaria cardamomum

Se ha realizado estudios in vitro que han demostrado los efectos antiinflamatorios y efectos inmunomoduladores del cardamomo. Estudios reportan la reducción significativa de colesterol, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos en ratas de laboratorio cuando se administra oralmente.

El cardamomo en dosis de 3 g en 2 dosis divididas por día durante 3 meses redujo la presión arterial sistólica, diastólica y media, aumentó la actividad fibrinolítica y mejoró el estado antioxidante en un estudio de individuos recién diagnosticados con hipertensión primaria (Nitasha, 2015)

Esta planta posee un alto potencial químico protector contra el cáncer de piel químicamente inducido en ratas de laboratorio y una disminución significativa en el nivel de peroxidación lipídica del hígado. El extracto de cardamomo demuestra un aumento significativo en la actividad citotóxica de las células natural killer (NK), indicando su potencial anticáncer (Kumari, 2013). Su semilla en polvo se prescribe con frecuencia en el tratamiento de trastornos gastrointestinales y se utiliza como estomacal, disolvente, retentivo, digestivo, antiemético y carminativo. Se usa regularmente en el tratamiento del estreñimiento, los cólicos, la diarrea, la dispepsia, los vómitos, la cefalea, la epilepsia, las enfermedades cardiovasculares, trastornos pépticos ácidos, gastritis, úlceras. Se conocen como fuentes de agentes antimicrobianos que actúan sobre las caries dentales y las bacterias orales asociadas a la enfermedad periodontal, sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Al-Sohaibani, 2011)

Citrus paradisi

La toronja (*Citrus Paradisi*) presenta un grado de citotoxicidad contra las células humanas de cáncer de próstata y pulmón (Zu, 2010)

Es inductora de apoptosis en células HL-60 debido a la presencia de citral, decanal y octanal (Hata, 2003). Por otra parte, mostró una fuerte actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudococcuspp.*, *Thyphimurium Salmonella*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*, y una fuerte actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Cándida albicans*, *Cladosporium cucumerinum*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, y *p. Chrysogenum*. La toronja fue 95% letal para los huevos y larvas de *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata*. Además, de ser un potente larvicida contra *Anopheles stephensi* a 80 ppm (Sanei, 2016).

METODOLOGÍA

Se realizó la obtención de los extractos etanólicos de *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi* por la técnica de maceración en frío, se utilizó 52.45g de *Elettaria cardamomum* con 100ml de etanol y 82.8g de *Citrus Paradisi* con 400ml de etanol se dejaron ambas en reposo 72 horas y posteriormente se filtró y se midió el rendimiento.

Se obtuvo un extracto sin presencia de grumos en condiciones óptimas para su análisis

Con una muestra de cada extracto se realizó el análisis fitoquímico siguiendo el protocolo de Domínguez (1973) para identificar de manera parcial los principales grupos químicos presentes en los extractos.

Se analizó el efecto antifúngico de los extractos contra *C. albicans* mediante la técnica de antibiograma por triplicado y se evaluó la sensibilidad a las 24 horas, sembrando 20um de *Candida Albicans* (ATCC) con técnica de estría cerrada, en agar sabourad colocando en cada caja petri 3 sensidiscos impregnados con 5um de extracto de cardamomo cada uno comparandose con los controles, clorhexidina al 2% como positivo y etanol como negativo, en otra caja de agar sabourad se sembró 20um de *Candida Albicans* (ATCC) con técnica de estría cerrada colocando 3 sensidiscos impregnados con 5um de extracto de toronja utilizando los mismos controles positivo y negativo, se evaluó la sensibilidad a las 24 horas,

RESULTADOS

El extracto de *Elettaria cadamomum* obtuvo reacción positiva en la presencia de esteroides, triterpenos, flavonoides, flavanonas, flavanoles, quinonas, taninos, al igual que el extracto de *Citrus Paradisi*. En la medición de los halos de inhibición que se analizaron resultó cada extracto tener un efecto antifúngico contra *C. albicans*.

CONCLUSIÓN

Los extractos de *Elettaria cardamomum* y *Citrus Paradisi* presentaron efecto antifúngico favorable contra el principal comensal causante de la candidiasis oral por lo que, se sugiere dar continuidad a su análisis, que permita sugerir su posible aplicación en el tratamiento de la candidiasis bucal y poder aplicarse como alternativa natural.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jayachandran, R. Katragadda, T. Ravinder, et al. Antifungal Susceptibility Pattern among Candida species: An Evaluation of Disc Diffusion and Broth Micro-dilution Method. *Journal of Microbiology & Infectious Diseases* vol. 18, 3, 2018, pp. 97–101.
2. Sanei-Dehkordi, M, Sedaghat, H, Vatandoost, Chemical Compositions of the Peel Essential Oil of *Citrus aurantium* and Its Natural Larvicidal Activity against the Malaria Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Comparison with *Citrus paradisi*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. Vol. 10, 4, 2016, pp. 77–85.
3. Singh, R. Verma, A. Murari, A. Agrawal, Candidiasis oral: una visión general. *J Oral Maxillofac Pathol*. Vol. 18, 1, 2014, pp. 81–85.

4. Nitasha, N. Nagendra, K. Vinodraj, Comparación de la eficacia del cardamomo (*Elettaria cardamomum*) con pioglitazona en la esteatosis hepática inducida por dexametasona, dislipidemia e hiperglucemia en ratas albinas, *J Adv Pharm Technol Res*. Vol. 6, 3, 2015, pp. 136-140.
5. Enoch, H. Yang, S. Aliyu, The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections, *Methods in Molecular Biology*, vol. 15, 8, 2017, pp. 17-65.
6. Telles, N. Karki, M. Marshall, Infecciones fúngicas orales. *Clínicas dentales de América del Norte*, vol. 61, 2, 2017, pp. 319–349.
7. Wall, D, Montelongo. *Candida albicans* crecimiento y dispersión de biopelículas: Contribuciones a la patogénesis. *Curr. Opin. Microbiol* vol. 11, 2019, pp. 1–6.
8. Sakaguchi, Treatment and Prevention of Oral Candidiasis in Elderly Patients, *Med Mycol J*. vol. 58, 2, 2017, pp. 43-49.
9. Hellstein, C. Marek, Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity, *Head Neck Pathol*, vol. 13, 1, 2019, pp. 25-32.
10. Millsop, LN Candidiasis oral. *Clin. Dermatol*, vol. 34, 2016, pp. 487–494.
11. Lakshmi, K. Sharanya, K. Govindasamy, S. Chitralekha, Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol. 9, 2018, pp. 1-6.
12. Chamba. Efecto antifúngico del aceite esencial del *proganum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE). 2015
13. Figueiredo, M. Kaplan, Pyrrolizidine alkaloides: A word of caution. *Ciência e Cultura*, 1997;49(5-6):331-8.
14. Lewis, D. Williams, Diagnosis and management of oral candidosis, *Br Dent J*. vol. 223, 9, 2017, pp.675-681.
15. Puerta P, C. Cardozo C., top-ten papers in fungal infection, *Rev Esp Quimioter*, vol. 31, 2018, pp. 32-34.
16. S. Al-Sohaibani, K. Murugan, Xerophilic aflatoxigenic black tea fungi and their inhibition by *Elettaria cardamomum* and *Syzygium aromaticum* extracts. *Saudi J Biol Sci*. vol. 18, 2, 2011, pp. 387–394.
17. S. Kumari, A. Dutta, Protective effect of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton against Pan masala induced damage in lung of male Swiss mice, *Asian Pac J Trop Med*, vol. 6, 7, 2013, pp. 25-31
18. Lockhart, J. Guarner, Emerging and reemerging fungal infections, *Seminars in Diagnostic Pathology*, Elsevier, 2019
19. V. Taissa, A. Sultan, Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity, *J fungi*, vol. 6, 1, 2020 pp. 15
20. W. Jillian, MS Nasim, Oral Candidiasis, *Clinics in Dermatology*, vol. 34, 4, 2016, pp. 437-528
21. Y. Zu, H. Yu, L. Liang, Y. Fu, Actividades de diez aceites esenciales para *Propionibacterium acnes* y cáncer PC-3, A-549 y MCF-7 Células. *Moléculas*. Vol. 15, 3, 2010, pp. 200-210.

MICROENCAPSULACIÓN DEL LÍQUIDO IÓNICO CYPHOS IL-101 CON BIOPOLÍMEROS PARA LA RECUPERACIÓN DE Pd(II)

Sofía Galilea Quiroz Yebra, Liliana Hernández Perales, Esperanza García Vieyra, Ricardo Navarro Mendoza

Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química.
sg.quirozyebra@ugto.mx

RESUMEN

La creciente demanda de recursos naturales no renovables como los metales estratégicos y preciosos ha llamado la atención de la comunidad investigadora en la última década hacia el desarrollo de procesos alternativos para la recuperación de estos metales de desechos industriales¹. El aumento en el uso del paladio, así como su alto valor comercial y las estrictas regulaciones medioambientales han originado gran interés por la recuperación de este metal desarrollando diversos métodos de recuperación, tal es el caso de la combinación de líquidos iónicos con biopolímeros para crear materiales únicos (microcápsulas)^{1,2}, que podrían abrir nuevas oportunidades para la recuperación y/o concentración de iones metálicos. Una de las diversas ventajas con las que cuentan los líquidos iónicos es la presión de vapor despreciable o casi nula, lo que los hacen buenos candidatos para sustituir a los solventes comerciales actualmente usados. En este trabajo se presentan los resultados de los materiales originados de la inmovilización del líquido iónico, Cyphos IL-101 (cloruro de trihexiltetradecilfosfonio) en microcápsulas de alginato de calcio mediante gelificación inversa las cuales se emplearon para la sorción de Pd(II) a partir de soluciones de HCl. La concentración de HCl influyó en la eficiencia de extracción del metal, las mejores eficiencias de extracción se obtuvieron a bajas concentraciones de ácido (0.33 M), al aumentar la concentración de HCl la eficiencia de extracción disminuyó de manera significativa. El efecto en las microcápsulas al evaluar diferentes tiempos de curado (1 y 3 semanas), no mostró un efecto importante sobre la velocidad de adsorción obteniéndose porcentajes de extracción mayores al 50% para ambos casos. La cinética de sorción está controlada por la resistencia a la difusión intrapartícula³, así como se propone que el Pd(II) se extrae como PdCl₄²⁻ mediante un mecanismo de intercambio aniónico entre los complejos aniónicos y el ion cloruro del líquido iónico Cyphos IL-101, aunque a bajas concentraciones de HCl también se extrae como Pd(OH)₂ o Pd(OH)Cl. Estos materiales pueden considerarse una alternativa prometedora a los sistemas convencionales para la recuperación de Pd(II) de soluciones de HCl.

INTRODUCCIÓN

Debido a la rápida industrialización, la demanda de metales tóxicos y de alto valor agregado se ha incrementado en la última década ocasionando que disminuyan las reservas naturales de minerales con altos contenidos de estos metales, trayendo como consecuencia la necesidad de explotar fuentes alternativas de metales, tales como residuos provenientes de materiales de desecho, como catalizadores, equipo electrónico, etc. Con frecuencia, dichos residuos poseen elementos tóxicos y la eliminación inadecuada de estos residuos ocasiona un grave problema de contaminación ambiental, debido a la presencia de metales tóxicos difíciles de recuperar.⁴ La separación/concentración de metales, no sólo implica beneficios medioambientales sino también económicos, debido al gran ahorro que conlleva la recuperación de los mismos. Las técnicas comúnmente empleadas para la eliminación de metales,⁵ incluyen la precipitación química,⁶ las resinas de intercambio iónico,⁷ la biolixiviación,⁸ y la extracción por solventes o extracción líquido-líquido, la cual es una de las técnicas más prometedoras en la recuperación y separación de metales de efluentes acuoso. Esta técnica puede ser empleada para tratar soluciones de diversas composiciones, como soluciones de lixiviación de minerales sulfurados, menas de bajo grado o efluentes industriales recuperándose metales con una pureza alta. A pesar de que estas técnicas han demostrado ser efectivas, presentan varias limitaciones debido a que algunos procesos son costosos e incapaces de remover niveles traza de iones metálicos. Un gran número de agentes de extracción han sido desarrollados para la separación de metales, incluyendo ácido fosfórico, α -

hidroxioximas, β -dicetonas, aminas y piridinas, al igual del tipo alquilimidazol, resultando ser candidatos atractivos para la extracción de iones de metálicos,⁹ debido a la alta selectividad que presentan. Estos solventes son muy volátiles, lo cual origina no sólo grandes gastos, sino un potencial problema de contaminación ambiental, por lo que las resinas impregnadas son una opción prometedora para la extracción de iones metálicos, ya que, en este sistema, el extractante líquido está disperso homogéneamente en la superficie de un medio sólido polimérico poroso, lo que origina menores cantidades del extractante empleado y un fácil procesamiento. Esta técnica puede ser combinada con las bondades de unos fascinantes compuestos llamados líquidos iónicos (LI's), los cuales han sido considerados como una nueva generación de solventes, esto debido a características específicas que los hacen únicos, tales como: alta estabilidad térmica, no son flamables, tienen una presión de vapor casi nula, lo que evita contaminación atmosférica, reduciendo o eliminando el empleo o generación de sustancias tóxicas peligrosas para el medio ambiente.¹⁰⁻¹¹ Recientemente, se ha propuesto la encapsulación de extractantes, para obtener microcápsulas (MC), cuyas características dependen del tipo de encapsulamiento, y de los materiales empleados. En base a lo anterior en este trabajo se prepararon y caracterizaron los materiales con extractantes encapsulados con biopolímeros a base de alginato, estos se fabricaron mediante el proceso de gelificación inversa. El extractante empleado fue el líquido iónico (LI) Cyphos IL 101 (cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio). Los parámetros experimentales estudiados fueron: el porcentaje de líquido iónico Cyphos IL 101 (10 y 30%) en las microcápsulas y el tiempo de curado (1 y 7 días). Con los materiales preparados, se evaluó la velocidad y la eficiencia de sorción Pd(II) de soluciones de ácido clorhídrico.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y metodología

El extractante empleado, líquido iónico, (LI), cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio, Cyphos IL 101 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, EE.UU.), número de C.A.S.: 258864-54-9, P.M: 519.31 g mol⁻¹) es un líquido ligeramente viscoso a temperatura ambiente menos denso que el agua (d: 0.8819 g m L⁻¹, a 25° C) con tonalidad incoloro a amarillo pálido. La estructura química es [P R₃R']⁺ Cl⁻, donde R= hexil y R'= tetradecil). Las disoluciones de paladio se prepararon a partir de cloruro de paladio(II) (PdCl₂•H₂O, Pressure Chemical Co), en agua desionizada. Para la fabricación de los materiales encapsulados se empleó, cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂•H₂O, Karal), sal sódica de ácido algínico de algas pardas, viscosidad media, y carboximetilcelulosa sódica (CMC), ambos reactivos suministrados por Sigma-Aldrich. Otros reactivos (sales, ácidos, etc.) fueron de calidad analítica y suministrada por KEM (México).

Preparación de las microcápsulas por gelificación inversa

En la elaboración de las microcápsulas, el núcleo fue preparado a partir de una mezcla de CMC 5.0 %, CaCl₂ 0.5 mol L⁻¹ y el líquido iónico Cyphos IL 101. La emulsión previamente homogenizada posteriormente fue extruida, mediante una técnica de goteo, en una solución de alginato de sodio 0.5 %; las microcápsulas permanecieron en alginato y con agitación durante un intervalo de tiempo de 1-3 min. Después, el material fue retirado y lavado con agua desionizada para retirar el exceso del alginato. Finalmente, las microcápsulas fueron dispersadas en una solución de CaCl₂ 0.5 mol L⁻¹ durante 24 h para dar firmeza al recubrimiento (curado) y evaluar las propiedades extractivas de Pd(II). También se obtuvo otro lote empleando 1 semana de curado, para evaluar su efecto.

Caracterización de las microcápsulas

Para poder apreciar las características físicas del núcleo (tamaño de partícula y color), recubrimiento (grosor) y morfología de cada uno de los materiales fabricados se realizó la observación por microscopía óptica de los materiales utilizando un estereomicroscopio STEMI 508, marca Zeiss.

Cinética de extracción de Au(III) y Pd(II)

Para este estudio se preparó una solución de Pd(II) de 100 mg L⁻¹ en HCl 0.33 mol L⁻¹. Posteriormente, se pesó 0.2 g de las microcápsulas y se pusieron en contacto con un volumen de 100 mL de solución de Pd(II). Se empleó un agitador orbital (SEV, modelo INO 650 V-7, México) con

una velocidad de agitación de 150 rpm a temperatura constante (20°C). Durante tiempos establecidos se colectaron alícuotas (0.2 mL) durante 4 días para evaluar la velocidad de sorción del paladio. El contenido de metal se determinó mediante espectrometría visible (espectrofotómetro UV-Vis, Varian Cary 50) a una longitud de onda de 289 nm.

RESULTADOS

Estabilidad de la emulsión

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la emulsión, se realizaron una serie de microfotografías ópticas, las cuales se muestran en la Figura 4, donde se puede observar que las gotitas de la emulsión, con el paso del tiempo, empiezan a coalescer lo que origina la formación de gotas más grandes. Lo anterior, sugiere que las emulsiones deben ser usadas, lo antes posible, para la preparación de las microcápsulas, a fin de mantener tamaños pequeños de las gotas de extractante en las MC, también se observó que no existe variación en cuanto al tamaño y estabilidad mecánica a medida que va transcurriendo el tiempo de fabricación, de los diferentes lotes.

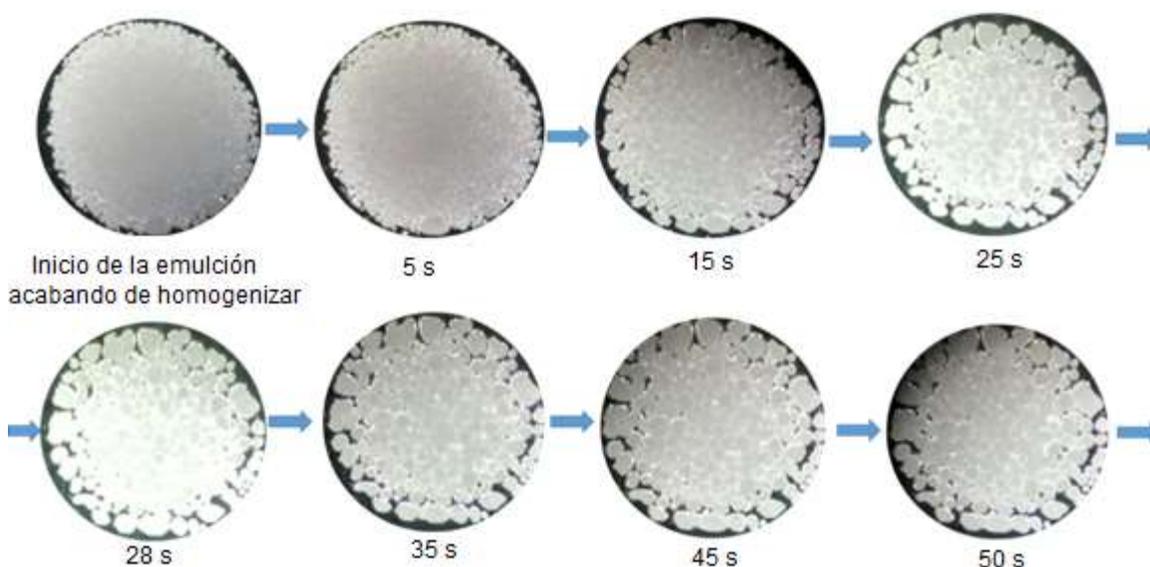


Figura 4. Emulsión vista en el microscopio estereomicroscopio.

Evaluación del desempeño de las microcápsulas preparadas en la extracción de iones metálicos
Se estudió la eficiencia de extracción con los diferentes lotes de MC, encontrando que la capacidad aumenta con el contenido de extractante y no cambia con el tiempo de curado de las MC, en cuanto a la velocidad de sorción de paladio, se muestran en la Figura 5, donde se observa la fracción residual de Pd(II) (C_t/C_0) en función del tiempo, para dos lotes de MC, uno con las MC recién preparadas (24 h de curado) y otro con 1 semana de curado, con el propósito de observar el efecto de esta variable. Las dos curvas son muy semejantes entre sí, mostrando que el tiempo de curado, en el intervalo estudiado (1-7 días), no afecta significativamente la capacidad y la velocidad de sorción del Pd(II). Tiempos de curado menores podrían tener un mayor efecto.

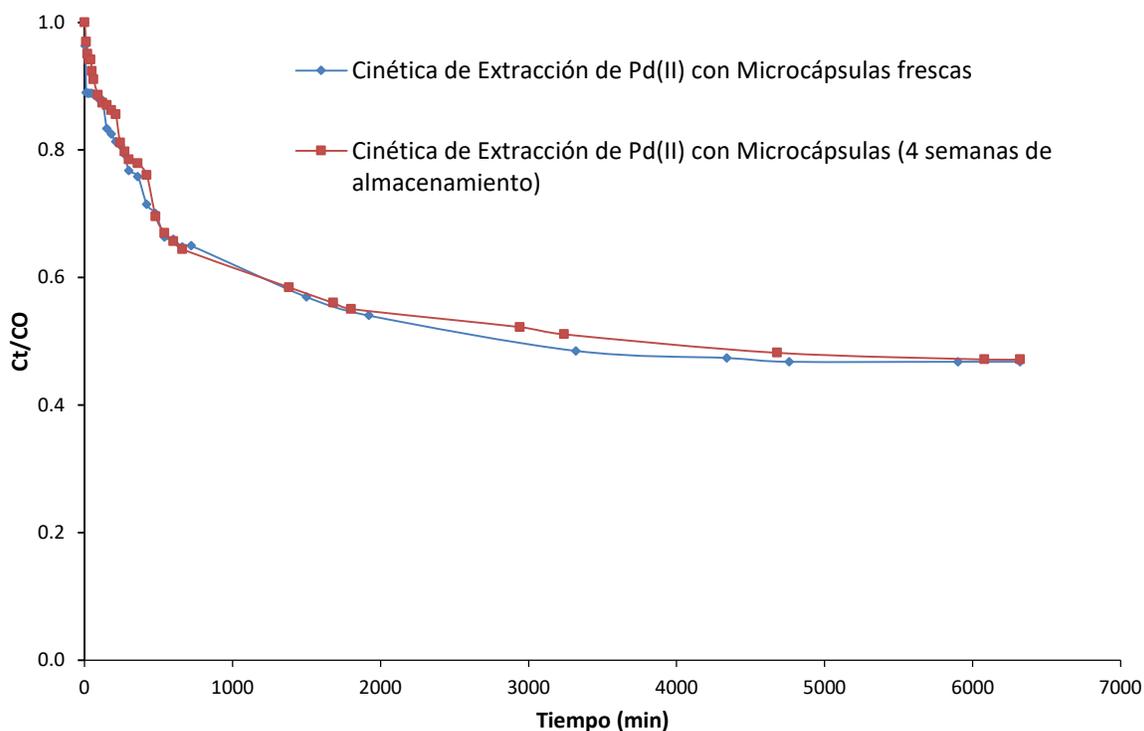


Figura 5. Cinética de sorción del Pd(II). $[Pd(II)] = 100 \text{ mg L}^{-1}$, $m/V = 0.1 \text{ g L}^{-1}$, $[HCl] = 0.33 \text{ mol L}^{-1}$; $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Por otro lado, se hizo un seguimiento de la apariencia macroscópica de las microcápsulas al ponerlas en contacto con el metal, obteniendo imágenes muy interesantes e ilustrativas, las cuales se pueden observar en la Figura 6. Estas imágenes muestran un cambio evidente en la coloración de las microcápsulas tras la sorción del metal. En un inicio (antes de la sorción de Pd(II)) flotaban y tenían una apariencia totalmente blanca y después, con el paso del tiempo de contacto, se fue evidenciando la extracción del metal con la formación de pequeños puntos color anaranjado en las microcápsulas, producidos por el metal extraído, para finalmente quedar con una alta carga de Pd(II), con una tonalidad café y sedimentadas en el fondo del recipiente. También fue evidente el cambio de coloración de la solución durante el proceso, inició con un color naranja y quedó casi incolora.

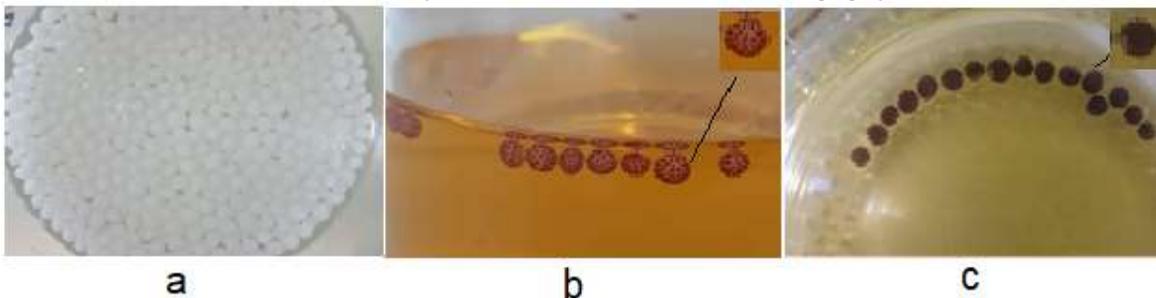


Figura 6. Microcápsulas obtenidas durante la cinética de sorción de Pd(II). a) MC antes de la extracción de Pd(II); b) MC después de 20 min de extracción; c) MC después de 90 min de extracción

Así mismo, se observa que conforme aumenta la concentración del extractante en las microcápsulas aumenta la capacidad de sorción de Pd(II). Por otra parte, se observó que las microcápsulas con mayor contenido de extractante (30 %) presentan mayor capacidad de sorción, pero menor velocidad de extracción Pd(II).

CONCLUSIONES

Se desarrollaron materiales con extractantes encapsulados fabricados por el método de gelificación inversa utilizando carboximetilcelulosa y alginato de sodio como biopolímeros, obteniéndose que al aumentar la cantidad de extractante, (Cyphos IL 101=10 y 30%), en las microcápsulas, aumenta la capacidad de sorción, pero disminuyen la velocidad de extracción del metal Pd(II).

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el empleo de estos nuevos materiales ofrece una posibilidad de interés para su aplicación en la recuperación de iones metálicos con alto valor comercial o ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por el apoyo recibido, a través de la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (CIIC 2020, Proyecto 250/2020), gracias al cual fue posible realizar este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. T. Vincent, A. Parodi, E. Guibal, "Immobilization of Cyphos IL-101 in biopolymer capsules for the synthesis of Pd sorbents", *Reactive & Functional Polymers.*, Vol. 68, 2008, pp. 1159–1169.
2. E. García, I. Saucedo, R. Navarro, "Encapsulation of Cyanex 302 with Alginate for Palladium Recovery", *Macromolecular Symposia.*, Vol. 374, 2017, 1600135.
3. J. Crank, "The Mathematics of Diffusion", Oxford University Press., 1975.
4. U.U. Jadhav, H. Hocheng, "A review of recovery of metals from industrial waste", *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering.*, Vol. 2, 2012, pp. 159-167.
5. M. Regel, "A review on methods of regeneration of spent pickling solutions from steel processing", *Journal of Hazardous Materials.*, 2010, pp. 57–69.
6. S. Mauchauffé, "Use of sodium decanoate for selective precipitation of metals contained in industrial wastewater", *Chemosphere.*, 2007, pp. 763–768.
7. N.C. Lin, "Ion-exchange equilibria of Cu(II) and Zn(II) from aqueous solutions with Chelex 100 and Amberlite IRC 748 resins", *Chemical Engineering Journal.*, 2005, pp. 211–218.
8. H. Deveci, H. Akacil, "Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron", *Hydrometallurgy.*, Vol. 73, 2004, pp. 293–303.
9. H. Morizono, T. Oshima, Y. Baba, "Liquid–liquid extraction of transition metal ions with an alkylhistidine extractant", *Separation and Purification Technology.*, 2011, pp. 390–395.
10. S. Sowmiah, V. Srinivasadesikan, "On the Chemical Stabilities of Ionic Liquids", *Molecules.*, Vol.14, 2009, pp. 3780-3813.
11. I.V., Pletnev, A.A. Formanovskii, S.V. Smirnova, "Ionic liquids as a new solvents for extraction and analysis". *Journal of Analytical Chemistry.*, Vol. 58, 2003, pp. 632-633.

APLICACIÓN DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EN LA INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

Oscar Antonio Sánchez Aguirre¹, Leticia Margarita Cano Asseleh², Alberto Sánchez Medina³, Gerardo Sánchez González³.

¹Centro de Investigaciones Biomédicas. ²Centro de Investigaciones Tropicales. ³Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz
oskar.aguirre92@gmail.com

RESUMEN

La continua aparición de nuevas enfermedades ha motivado al hombre a buscar soluciones o paliativos para estos males, siendo el uso de plantas una de las mejores estrategias. El 80% de la población mexicana hace uso frecuente de la medicina tradicional para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Sin embargo, de las aproximadamente 3,000 a 4,500 plantas medicinales inventariadas, solamente se ha hecho análisis farmacológico del 5%. Por lo que, el estudio químico y biológico de las plantas medicinales es de suma importancia. La búsqueda de metabolitos secundarios con actividad biológica en extractos vegetales ha sido mediante ensayos biodirigidos, la cual es una herramienta valiosa y exitosa. No obstante, presenta algunos inconvenientes, se trata de un proceso repetitivo que consume una gran cantidad de material vegetal, recursos y tiempo. Así mismo, se ha visto la pérdida de la actividad biológica debido a la dilución de los metabolitos de interés debido al fraccionamiento realizado. Por esta razón, se ha buscado nuevas alternativas para buscar metabolitos secundarios activos en extractos vegetales y este ha sido mediante la aplicación de métodos quimiométricos. La quimiometría es descrita como la interacción de métodos matemáticos y estadísticos en los procesos de medición química. Esta herramienta se ha desarrollado como consecuencia del cambio en los datos obtenidos con la aparición de nuevas técnicas analíticas además de microprocesadores. El surgimiento del pensamiento quimiométrico se produjo al darse cuenta de que las estadísticas univariadas tradicionales ya no eran suficientes para describir y modelar experimentos químicos. Para la obtención de una mejor calidad en los procesos de separación en el análisis cualitativo y cuantitativo de las condiciones cromatográficas y espectroscópicas estas deben optimizarse en función de los objetivos analíticos particulares. Por lo que, deben definirse claramente factores importes y significativos como el disolvente, la fase móvil, el pH, y la temperatura de la columna que pudieran afectar los resultados de un análisis, así como, acercarse a la realidad química de una muestra. El siguiente paso se trata de determinar la resolución o la calidad de separación medida en términos de respuesta y/o función de su optimización, seguida por el desarrollo de un modelo matemático o estadístico que describe esta relación entre los parámetros analíticos (espectroscópicos / cromatográficos) y las respuestas de los experimentos diseñados. La quimiometría puede ser clasificada en dos categorías en análisis cualitativo y cuantitativo. El primero es el análisis de los componentes principales (PCA), su principal objetivo es reducir la dimensionalidad de los datos en un conjunto menor, de modo que los datos originales se transforman en nuevas variables (componentes principales) no correlacionadas entre sí (ortogonales), siendo estas nuevas variables una combinación lineal de variables originales. El segundo es el método de proyecciones parciales de mínimos cuadrados (OPLS) o también conocido como Proyección de Estructuras Latentes es una técnica multivariable supervisada, con la cual se puede describir una relación lineal entre la variable dependiente "y" (actividad biológica), con una o varias variables independientes X (perfiles metabólicos).

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional actualmente es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un recurso fundamental para el tratamiento de problemas de salud de millones de seres humanos [1]. Es un elemento importante de las culturas indígenas, un conocimiento milenario que ha resguardado, particularmente en lo referente a su herbolaria, que es el uso de las plantas medicinales de su entorno, lo que constituye un valor incalculable que fortalece y preserva su identidad.

De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas. Sin embargo, uno de los principales problemas es su carácter empírico, por lo que es necesario generar estudios científicos que avalen el uso de la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades o que advierta de sus efectos tóxicos [2]. Cabe mencionar que tan solo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas en busca de compuestos bioactivos, esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos. La continua aparición de nuevas enfermedades ha motivado al hombre a buscar soluciones o paliativos para estos males, siendo el uso de plantas una de las mejores estrategias. El estudio científico de las plantas y sus componentes químicos se ha enfocado en conocer sus propiedades medicinales y actividad biológica. De esta manera, el objetivo principal de la fitoquímica es el estudio científico de las plantas tóxicas, medicinales e inclusive las que hasta ahora no han sido utilizadas con fines terapéuticos, buscando encontrar alguna actividad biológica en sus extractos, aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes y más aún encontrar el o los principios activos involucrados [3].

Los metabolitos secundarios aislados de extractos vegetales pueden ser utilizados como agentes terapéuticos, así como, pueden ser los materiales de inicio en los procesos de síntesis química. También pueden servir como modelo para la síntesis de fármacos con actividad biológica [4].

El aislamiento de los metabolitos secundarios y la evaluación de la actividad biológica de los mismos se ha realizado mediante ensayos bio-dirigidos que durante muchos años ha generado muy buenos resultados. No obstante, presenta algunos inconvenientes, para llevar a cabo este ensayo se necesita una gran cantidad de materiales, reactivos químicos y biológicos, así como disolventes orgánicos lo cual resulta muy costoso y en algunos casos los metabolitos aislados llegan a perder su actividad biológica al pasar por el mismo proceso varias veces. Por esta razón, en el presente trabajo se discutirá la aplicación de la quimiometría como una alternativa para el aislamiento e identificación de compuestos bioactivos en plantas medicinales.

Aislamiento y purificación de productos naturales bioactivos

A través de la historia, la humanidad siempre ha tenido interés en fuentes naturales de origen prebiótico, microbiano, vegetal y animal. Los extractos de plantas se han aprovechado ampliamente para varias cosas como la elaboración de perfumes, como saborizantes y conservadores de alimentos, en medicina popular, etc. Sin embargo, el principal uso que se le han dado a estas plantas es el medicinal para tratar enfermedades crónicas y comunes. Las plantas poseen metabolitos secundarios bioactivos como alcaloides, esteroides, taninos, glicósidos, fenoles, flavonoides, aceites esenciales que suelen ser encontrados en sus diferentes partes, los cuales le otorgan una infinidad de propiedades químicas y biológicas [5].

Los productos naturales contenidos en los extractos de las plantas medicinales es una mezcla bastante compleja de componentes químicos de diferentes polaridades, siendo el principal reto en fitoquímica obtener un compuesto bioactivo puro, que implica llevar a cabo diferentes procesos de separación y purificación [5]. Los principales métodos de aislamiento y purificación de compuestos bioactivos en plantas medicinales incluyen métodos cromatográficos.

La separación de los componentes de un extracto vegetal se puede llevar a cabo mediante partición, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), basado en sus propiedades químicas y físicas como polaridad, tamaño y funcionalización química [6]. No obstante, los principios básicos del aislamiento y purificación de productos naturales no han cambiado mucho en los últimos 50 años. Sin embargo, nuevos métodos cromatográficos han sido desarrollados y recientemente, la cromatografía en columna convencional ha evolucionado considerablemente [7].

La cantidad de compuestos activos que poseen las plantas medicinales son siempre bastantes bajas. Los procedimientos de extracción y aislamiento requieren mucho tiempo y bastante trabajo en el laboratorio, esta ha sido una limitante en la aplicación de productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos. Por lo que, existe una gran necesidad de desarrollar métodos más efectivos y selectivos para la extracción y aislamiento de compuestos bioactivos de extractos de plantas [8].

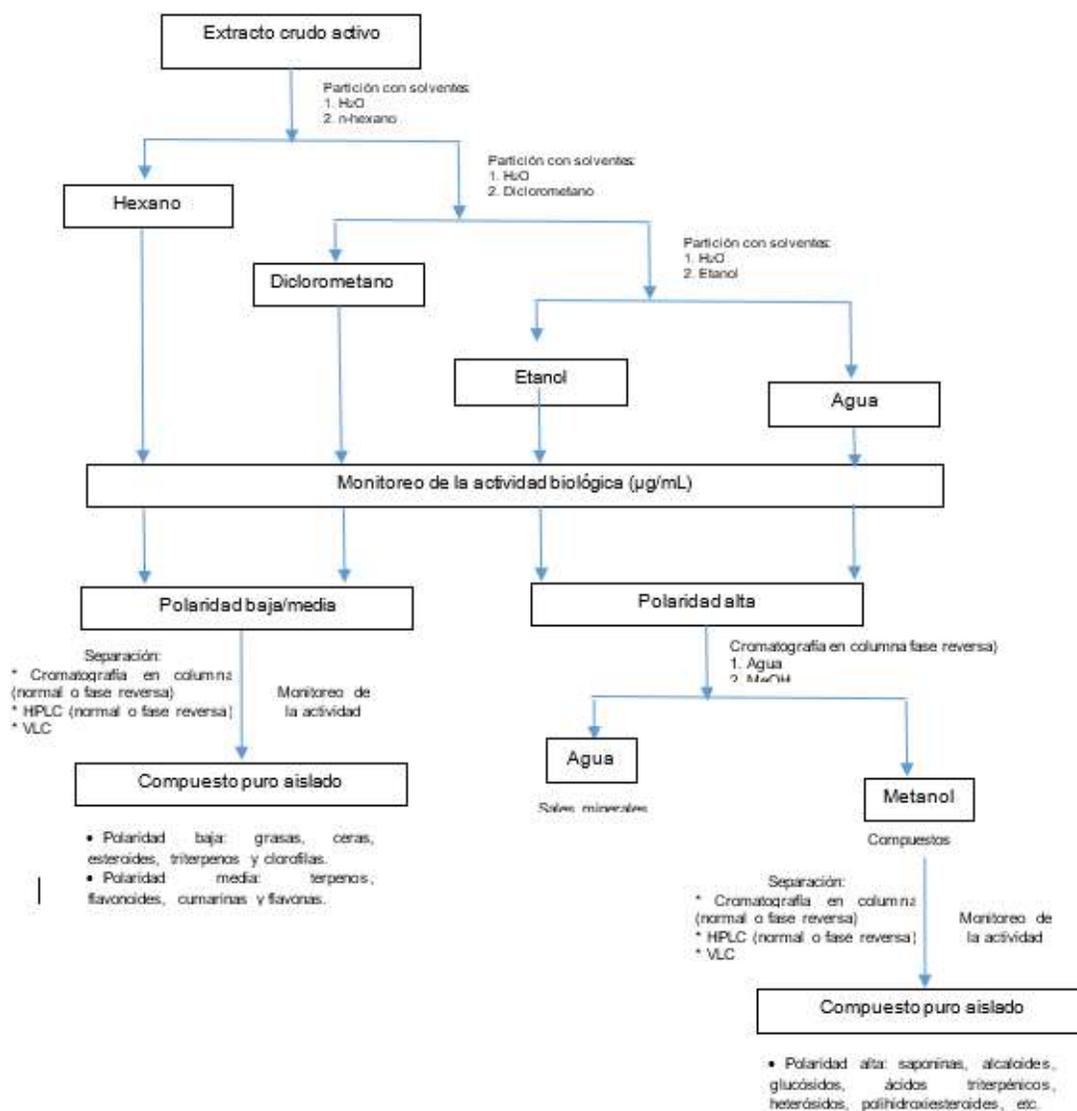


Figura 7. Proceso de aislamiento de compuestos puros bioactivos a partir de extractos vegetales

Fuente: modificado de Ebada *et al.*, 2008 [11].

La estrategia más utilizada y con mayor éxito para el aislamiento y detección de compuestos bioactivos ha sido el aislamiento guiado por bioensayos o también conocido como ensayo bio-dirigido (figura 1). Esta metodología implica un fraccionamiento repetitivo a escala preparativa y la evaluación de la actividad biológica hasta que se logra el aislamiento de los compuestos activos [9]. Sin embargo, esta metodología presenta importantes desventajas: requiere mucho tiempo para lograr separar un compuesto, necesita grandes cantidades de disolventes, reactivos y material biológico y el riesgo de perder la actividad de interés debido a los procesos de dilución o descomposición que pudieran presentarse a lo largo de este proceso [10].

El ensayo bio-dirigido ha sido indudablemente la mejor forma de obtención de estos compuestos bioactivos. Sin embargo, actualmente existen nuevos métodos para la detección de productos naturales, en este sentido, los bioensayos son combinados con métodos quimiométricos.

Quimiometría

El término "Quimiometría" se refiere a la química con matemáticas aplicadas. Enfatiza que la quimiometría, aunque basada en las matemáticas aplicadas, es una rama aplicada de la ciencia química definida por sus intereses y problemas. Según Wold, el enfoque principal de la quimiometría es "estructurar el problema químico en términos matemáticos" y que, en lugar de formar una rama separada de la química, la quimiometría debe "seguir siendo una parte integral de todas las áreas de la química" [12].

En 1997, D.L. Massart define a la quimiometría como la disciplina que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos y obtener conocimiento de sistemas químicos. En perspectiva esta última definición incluye el uso de la lógica formal, base de la inteligencia artificial, y enfatiza que la información debe ser "relevante", y que la información sobre el sistema químico debe ser interpretada en conocimiento global sobre el problema en estudio [13].

La *International Chemometrics Society* define a la quimiometría como "la ciencia de relacionar las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico con el estado del sistema mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos" [14].

La Farmacopea Europea en 2016 [15] define a la quimiometría con objetivos más específicos: "la disciplina química que utiliza los métodos matemáticos y estadísticos para a) diseñar o seleccionar procedimientos y experimentos de medición óptimos y b) proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos".

Sin embargo, se pueden encontrar muchas otras variantes en la literatura que destacan aspectos de análisis químico, estadística, información y análisis de datos. De alguna manera ha logrado mantener su estado junto con, pero de alguna manera independiente de, campos establecidos de química e incluso química analítica.

Historia de la quimiometría

El científico sueco Svante Wold acuñó la palabra quimiometría (o en kemometri sueco) para una solicitud de subvención a fines de 1971 y luego se unió a Kowalski en 1974 para crear la *International Chemometrics Society*. El primer artículo con la palabra quimiometría fue publicado por Wold en 1972. A Wold y Kowalski se les atribuye la creación de quimiometría, pero en la práctica, aunque ciertamente entre los pioneros importantes, nombraron una disciplina existente que ya se había sembrado a mediados de la década de 1960. La quimiometría se puede considerar como un área que despegó con el advenimiento de la computación científica, especialmente con el desarrollo de instrumentación computarizada basada en laboratorio. En la década de los 80's se publicaron las primeras revistas dedicadas a quimiometría: "*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*" y "*Journal of Chemometrics*". EL primer libro con quimiometría en el título, varios simposios de ACS, la primera serie de libros (Research Studies Press), el primer software dedicado (ARTHUR, SIMCA y UNSCRAMBLER) y los primeros talleres [16].

Sin embargo, el avance más significativo de la quimiometría se produjo ya en el siglo XXI con varias empresas de desarrollo de software, que promovieron la intelectualización de equipos y ofrecieron nuevos métodos para la construcción de instrumentos de separación más eficientes. Estos equipos han abierto muchas opciones para mejorar el método de análisis de datos, con lo cual, la quimiometría se ha convertido en una herramienta importante dentro de la química analítica [17].

Alcances de la quimiometría

Entre los alcances de la quimiometría se encuentran: el diseño de experimentos, la validación de métodos analíticos, el procesamiento de señales espectroscópicas y cromatográficas, las técnicas de calibración, el reconocimiento de patrones y las relaciones estructura actividad.

Los métodos quimiométricos consisten principalmente en técnicas de modelado de datos multivariados que dan como resultado modelos matemáticos empíricos que se utilizan posteriormente para la predicción indirecta de propiedades de interés [18].

Los métodos multivariados se aplican para el análisis de datos químicos o relacionados, aunque los algoritmos en cuestión se pueden usar para extraer información de casi todos los datos, de origen químico, físico, biológico, farmacéutico etc. Todo ello contribuye en gran medida a la comprensión del sistema, cuando el conocimiento y la teoría limitados no explican suficientemente el comportamiento observado [15].

Las aplicaciones de la quimiometría pueden ser cualitativas o cuantitativas, y pueden ayudar al analista a estructurar el conjunto de datos y reconocer las relaciones de variables ocultas dentro del sistema. Los métodos cualitativos reconocen patrones, en donde el principal objetivo es la clasificación de las muestras de acuerdo a sus propiedades; los métodos cuantitativos utilizan la calibración multivariable, cuyo objetivo es desarrollar modelos que ayuden a predecir alguna propiedad ya sea química o biológica de interés [19].

Las técnicas de manejo de datos para análisis multivariados se pueden dividir en dos categorías: sin supervisión y supervisadas. Las herramientas no supervisadas utilizan solo la matriz X para extraer información, pero en el análisis de datos supervisados, además de la matriz X , las muestras también se describen mediante un vector Y o variable Y . Esta es una tabla $m \times 1$ que contiene información de alguna propiedad de las muestras (por ejemplo, concentración, actividad de inhibición enzimática, actividad de inhibición antimicrobiana, etc.).

Las técnicas de análisis de datos supervisados se utilizan para construir un modelo entre la matriz X y el vector Y . En el modelado quimiométrico, las ecuaciones proporcionadas son datos conducidos para describir empíricamente la varianza subyacente en los datos para propósitos no supervisados o supervisados.

Los enfoques de proyección de la técnica no supervisada (PCA: Análisis de componentes principales) y técnica supervisada (PLS: regresión parcial de mínimos cuadrados) más comúnmente utilizados, por naturaleza, transforman una gran cantidad de variables X potencialmente correlacionadas, como intensidades en diferentes tiempos de retención o longitudes de onda, en un número posiblemente menor de variables no correlacionadas. Cuando las muestras del espacio de datos original se proyectan en este espacio de menor dimensión, las coordenadas simples resultantes se denominan puntuaciones T (*Scores-T*). La visualización de las puntuaciones a lo largo de dos o más componentes principales (PCs) forma un gráfico de puntuación que contiene información sobre las relaciones entre las diferentes muestras. Las cargas P (*Loading-P*) son una combinación lineal de las variables originales y los coeficientes o “pesos” utilizados en esta combinación lineal. Las cargas para variables específicas también se pueden trazar en lo que se llama un diagrama de carga (*Loading plot*). El *Loading plot* contiene información sobre la importancia relativa entre las variables originales. Tanto las puntuaciones como los diagramas de carga permiten la visualización y la comprensión de la estructura de datos subyacente (es decir, la presencia de grupos / *clusters* y / o valores atípicos) dentro de un espacio dimensional reducido. La matriz variable (E) producida por el modelo se define como los errores residuales. La información simple a lo largo de ejes de varianza común es capturada por los PCs del modelo, la variación no explicada por estas PC (error residual) se deja para cada muestra en cada variable, formando la matriz residual (E) [20].

Los mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS) es una técnica de análisis multivariado supervisada, es una extensión de PLS y aborda el problema de regresión. OPLS separa la variación sistemática en X en dos partes, una parte que está correlacionada (predictiva) con Y y una parte ortogonal (no correlacionada) con Y , esto proporciona una mejor interpretación del modelo. En el caso de una sola Y , solo hay un componente predictivo, y todos los componentes más allá del primero reflejan variación ortogonal. Los datos de OPLS para los diferentes componentes son interpretables de la manera habitual, ya que se preservan los puntajes, las cargas y los parámetros basados en residuos con un significado familiar [21].

Quimiometría en química analítica

La quimiometría es un campo altamente interdisciplinario (figura 2) cuya relevancia entre las disciplinas químicas, en general, y la química analítica, en particular, ha crecido considerablemente a lo largo de los años. A pesar de esto, muchos químicos analíticos aún lo desconocen en gran medida y, a menudo, son mal utilizados o no son completamente entendidos por los profesionales que confían en esas muy pocas técnicas implementadas en el software comercial más extendido.

Sin embargo, la quimiometría representa una gran cantidad de posibilidades para los químicos analíticos, ya que es una disciplina que acompaña el flujo de trabajo analítico en todas las etapas de la investigación [22].

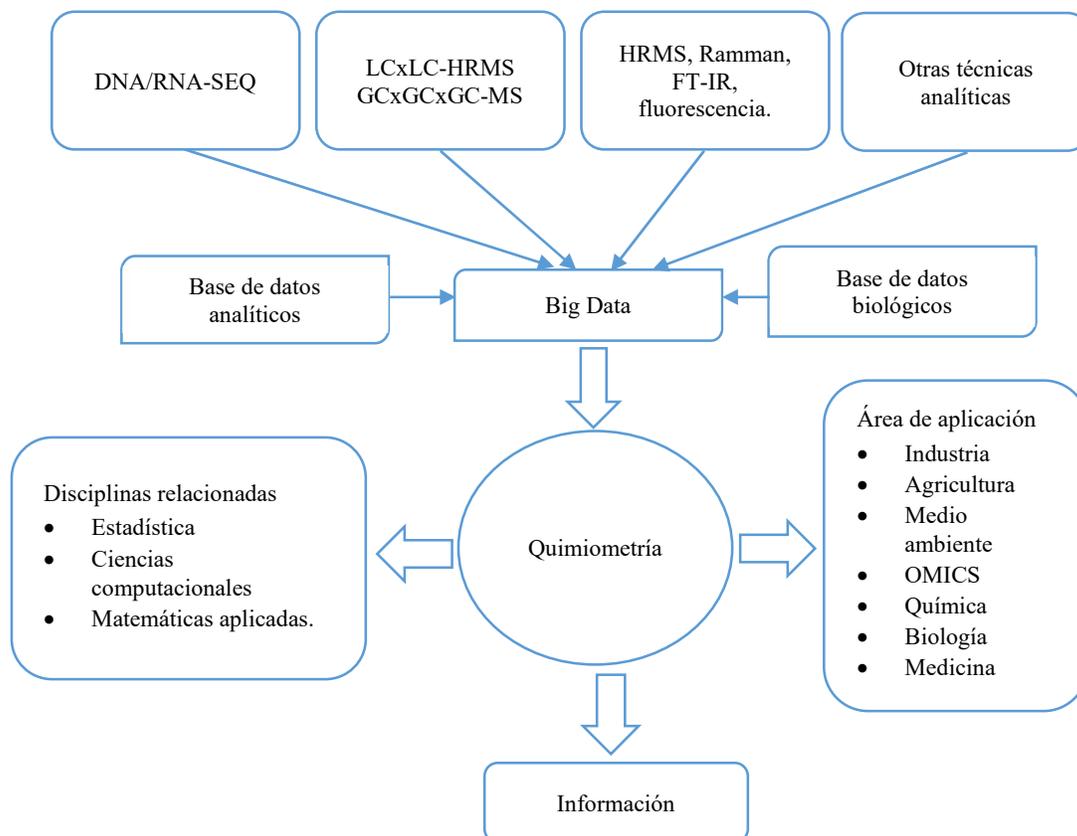


Figura 2. La quimiometría como campo interdisciplinario [22].

Actualmente cada científico utiliza un software, de una forma u otra, relacionado con los métodos matemáticos o con el procesamiento de resultados. Aparte de los métodos matemático-estadísticos, los temas de la quimiometría también se relacionan con problemas del laboratorio relacionados con métodos para manejar bases de datos químicos o espectroscópicos, y con métodos de inteligencia artificial. Es decir, los quimiométricos contribuyen al desarrollo de todos estos métodos. Por regla general, estos desarrollos están dedicados a requisitos prácticos particulares, tales como la optimización automática de las separaciones cromatográficas o la predicción de la actividad biológica de un compuesto químico. Para ello los analistas quimiométricos deben tener en cuenta los 3 principios básicos para llevarla a cabo [23]:

1. Ningún dato es redundante, la metodología multivariante en el diseño experimental y análisis de datos.
2. Cualquier dato contiene un componente indeseable llamado ruido.
3. Buscar variables ocultas.

La quimiometría mejora la búsqueda y el aislamiento de productos naturales bioactivos de fuentes naturales. Este método ofrece ventajas sobre el ensayo fitoquímico clásico, entre las cuales se pueden mencionar: la optimización de tiempo de análisis, reducción de costos, menor impacto ambiental y bajo consumo de material biológico [24].

Actualmente, las técnicas quimiométricas se utilizan cada vez más y de manera rutinaria en estudios de detección de productos naturales, de perfiles quimio taxonómicos, origen geográfico de plantas medicinales, y con fines de control de calidad en la industria farmacéutica [9].

Quimiometría en la investigación de productos naturales

Las técnicas espectroscópicas y cromatográficas han sido las más utilizadas en la estandarización de plantas medicinales. Sin embargo, estas no son fáciles de analizar debido a la complejidad de los componentes químicos que poseen. En los últimos años se han dado a conocer nuevos métodos analíticos de última generación para analizar a las plantas medicinales lo que ha generado una cantidad significativa de datos en las mediciones que se han producido. Los métodos quimiométricos son una buena herramienta para analizar la información más útil obtenida de los datos originales [25]. La aplicación de análisis cromatográficos acoplados a espectroscopia (IR,UV,RMN) o espectrometría (Masas) son utilizados para obtener múltiples perfiles metabólicos de diferentes mezclas. Estos estudios permiten identificar casi todo tipo de componentes e incluso aquellos que pudieran perderse en los procesos de aislamiento y purificación, por lo que ha sido de gran ayuda ya que se consideran todos los compuestos que posee la muestra en lugar de someter una serie de fracciones distintas. Los resultados de estos perfiles metabólicos muestran el conjunto de datos de los componentes que se encuentran en mayor cantidad y los menores [26].

Los estudios quimiométricos son utilizados principalmente para construir un modelo predictivo para detectar a los productos naturales bioactivos que generan una actividad biológica de interés (actividad antioxidante, citotóxica, anti-inflamatoria, antimicrobiana,etc.) de plantas conocidas fitoquímicamente. Para la elaboración de este modelo se requiere un número significativo de muestras en las que se pudiera determinar la actividad biológica en un futuro, pero sin haber aislado ninguno de los compuestos bioactivos [27]. Esta técnica ya ha sido demostrada, Gao et al., 2010 estudió una especie vegetal fitoquímicamente conocida y demostró que con la ayuda de la quimiometría es posible identificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica de interés utilizando un número limitado de muestras [28].

El método de huellas dactilares por HPLC fue introducido y aceptado por la Organización Mundial de la Salud como una herramienta para el control de calidad de plantas medicinales, así como la Oficina de Administración de Medicamentos de China (DABC) para la estandarización de plantas medicinales chinas y sus materias primas, también la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (DFA) y por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA). La cuantificación de los compuestos bioactivos en extractos vegetales puede ser determinada cuando se conocen y pueden obtenerse fácilmente estándares puros. Por lo que, la combinación del análisis cuantitativo con huellas dactilares por HPLC resulta ser confiable para la identificación, discriminación y autenticación de plantas medicinales [29].

La aplicación de métodos quimiométricos para la detección de metabolitos secundarios bioactivos responsables la actividad biológica de interés y la construcción de modelos para la actividad biológica en extractos vegetales han sido hasta ahora las aplicaciones más relevantes, no obstante, el aislamiento guiado de compuestos bioactivos de especies vegetales que no poseen información fitoquímica con métodos quimiométricos ha sido escasamente utilizada. Por ejemplo, Sánchez (2020) evaluó la actividad antibacteriana de extractos de etanol, metanol, agua y mezclas de etanol-agua de *Egremia menziesii* frente a las bacterias Gram positivas: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y Gram negativas: *Escherichia coli* y *Salmonella entérica serovar Typhimurium*. Mediante métodos quimiométricos de los datos espectroscópicos (¹H-RMN y FT-IR) y de los ensayos de actividad antibacteriana los proceso mediante análisis multivariado de PCA y OPLS logró identificar a manitol en todos los extractos como componente mayoritario y relacionado con la actividad [30].

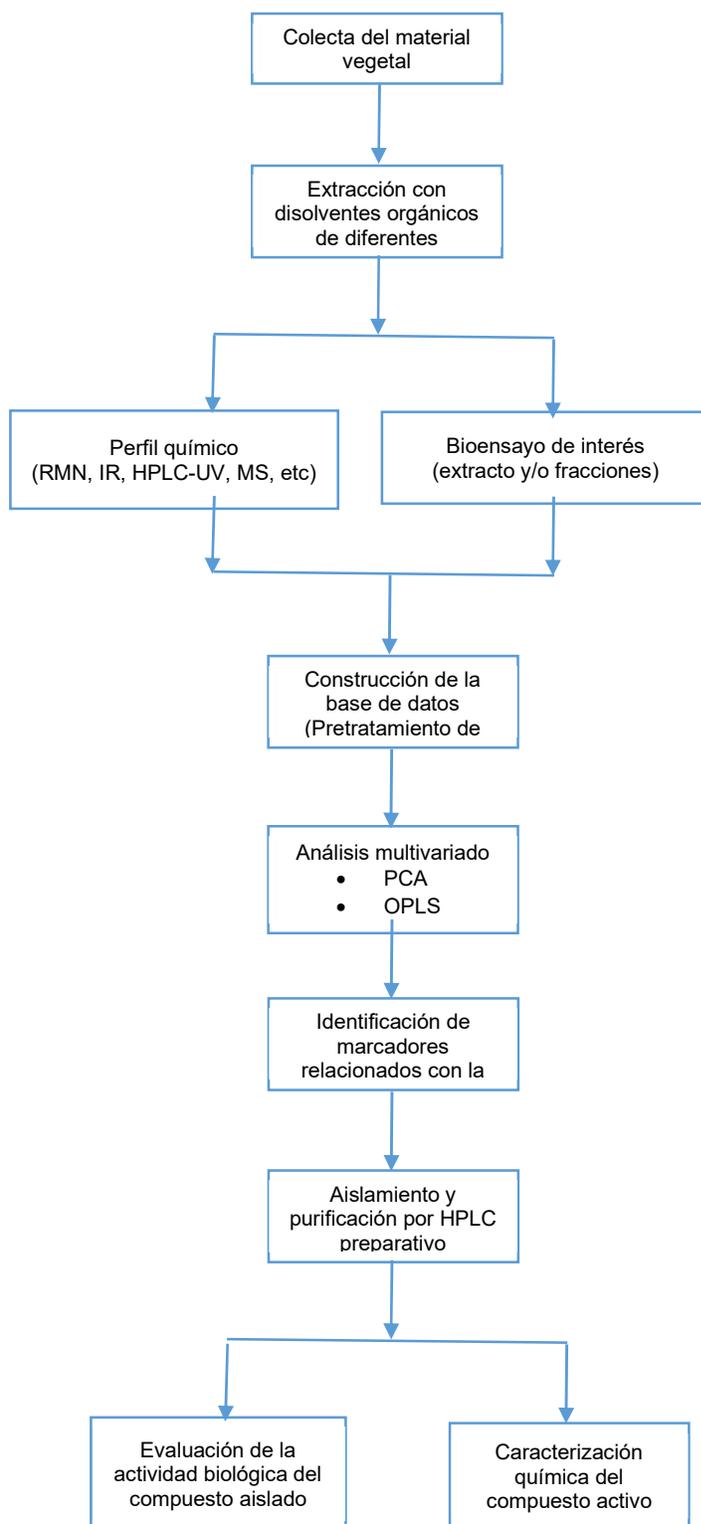


Figura 3. Diagrama de trabajo para el aislamiento de compuestos bioactivos con métodos quimiométricos

Fuente: modificado de Sánchez, 2020 [30].

Lo descrito hasta este momento demuestra el potencial de los métodos quimiométricos como una alternativa en la investigación de productos naturales bioactivos provenientes de plantas medicinales, por lo que, en la figura 3 se propone un diagrama de trabajo para llevar a cabo este procedimiento.

El análisis de componentes principales (PCA) es el método multivariante más utilizado en quimiometría para el reconocimiento de patrones donde el principal objetivo radica en la identificación y clasificación de las muestras de acuerdo con sus propiedades [31]. Además, reconoce patrones de diferencia sin necesidad de identificar o conocer los constituyentes del extracto, generando agrupación y dispersando las muestras analizadas por similitud o diferencias en composición, respectivamente [18].

CONCLUSIÓN

La aplicación de métodos quimiométricos en la investigación de productos naturales es una nueva alternativa para detectar a los metabolitos secundarios bioactivos presentes en extractos vegetales responsables de una actividad de interés en comparación con métodos tradicionales del ensayo-bio-dirigido, de esta manera se evitará el uso excesivo de reactivos químicos y material biológico, así como optimizar los procesos de detección de aislamiento de principios activos de especies vegetales en peligro de extinción. También resulta útil cuando el principio activo responsable de la actividad biológica de interés se encuentra en pequeñas cantidades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. "Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023", Organización Mundial de la Salud, 2013.
2. S. Ocegueda, E. Moreno, P. Koleff, "Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica". *Biodiversitas*, 2005; 62: 12-15.
3. C. Rivas-Morales, M. Oranday-Cárdenas, M. Verde-Star, "Investigación en plantas de importancia médica", *Omnia science*. 2016: 1-40.
4. M. Orozco, "Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente", 2014, Universidad Autónoma de Nuevo León.
5. M. Rasul, "Extraction, Isolation and characterization of Natural Products from Medicinal Plants", *Int. J. Basic Sci. Appl. Compu*, 2018.
6. A.M. Salam, J.T. Lyles, C.L. Quave, "Methods in the Extraction and Chemical Analysis of Medicinal Plants", Springer Protocols, 2019.
7. S.D. Sarker, L. Nahar, "An introduction to natural products isolation". *Methods Mol. Biol.* 2012.
8. Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med. (United Kingdom)*", 2018.
9. A.A. Cornejo-Báez, L.M. Peña-Rodríguez, R. Álvarez-Zapata, M. Vázquez-Hernández, A. Sánchez-Medina, "Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products". *Drug Discov. Today*. 2020.
10. G. Brusotti, I. Cesari, A. Dentamaro, G. Caccialanza, G. Massolini, G. "Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014.
11. S.S. Ebada, R.A. Edrada, W. Lin, P. Proksch, "Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates". *Nat. Protoc.* 2008.
12. S. D. Brown, "The chemometrics revolution reexamined", *J Chemometr.*, Vol. 31,1, 2017, pp. 1-23.
13. G. Ramis, C. Álvarez, "Quimiometría", Editorial Síntesis: Madrid, 2010.
14. D.B. Hibbert, "IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics", *Anal. Chim. Acta*, Vol. 642, 2009, pp. 3-5

15. Farmacopea Europea, "Chemometric methods applied to analytical data", 2016, Cap. 5.21: 783-800.
16. R. G. Brereton, "A short history of chemometrics: a personal view", *J Chemometr.*, Vol. 28, 10, 2014, pp. 749-760.
17. N. Kumaretal, "Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview", *Talanta.*, Vol. 123, 2014, pp. 186–199.
18. R. Álvarez, "Aplicación de métodos quimiométricos para la detección de metabolitos con actividad leishmanicida en el extracto de la raíz de *Colubrina greggii* var. *yucatanensis*". Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatan. Junio 2015.
19. H. A. Gad , S.H. El-Ahmady, M.I. Abou-Shoer, M.M. Al-Azizi, "Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review", *Phytochem. Anal.*, Vol. 24 (1), 2013, pp. 1–24.
20. Farmacopea de Estados Unidos. Cap. 1039. "Chemometrics" 2017, pp. 6831-6848.
21. Guide, U. "User Guide SIMCA® 15 Multivariate Data Analysis Solution". 2017.
22. R. G. Brereton, J. Jansen, J. Lopes, F. Marini, A. Pomerantsev, O. Rodionova, J.M. Roger, B. Walczak, R. Tauler, "Chemometrics in Analytical Chemistry—Part II: Modeling, Validation, and Applications", *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 410, 26, 2018, pp. 6691–6704.
23. M. Otto, "Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry", tercera edición, Wiley, 2016.
24. R. Martínez, "Estudio quimiométrico de la propiedad antiproliferativa de *Plantago australis* Lam". Tesis de maestría, Universidad Veracruzana, 2016.
25. A. Bansal, V. Chhabra, R.K. Rawal, S. Sharma, "Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization". *J. Pharm. Anal.* 2014.
26. J.J. Kellogg, D.A. Todd, J.M. Egan, H.A. Raja, N.H. Oberlies, O.M. Kvalheim, N.B. Cech, "Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and Application to Identification of Bioactive Compounds". *J. Nat. Prod.* 2016.
27. R. Alvarez-Zapata, A. Sánchez-Medina, M. Chan-Bacab, K. García-Sosa, F. Escalante-Erosa, R.V. García-Rodríguez, L.M. Peña-Rodríguez, "Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants", *J. Chromatogr. A.*
28. J. Gao, H. Zhao, P.J. Hylands, O. Corcoran, "Secondary metabolite mapping identifies Scutellaria inhibitors of human lung cancer cells", *Pharm. Biomed. Anal.*, 2010.
29. V.H. Miguez, J.M. David, J.P. David, "Determination of polyphenols in: Schinus terebinthifolius Raddi bark extracts and chemometric analysis", *Anal. Methods*, 2020.
30. G. Sánchez, "Estudio quimiométrico de la actividad antibacteriana de los extractos de *Egregia menziesii*", Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana, Enero 2020.
31. M. Rozete, "Caracterización fitoquímica y evaluación sensorial de variedades de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de Yucatán". Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2020

ESTUDIO DEL MECANISMO DE EXTRACCIÓN DE DICLOFENACO POR MEDIO DE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS.

Diana Esmeralda Martínez Rodríguez., María del Pilar González Muñoz., Liliana Hernández Perales., Mario Avila Rodríguez.

Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas.
diany.mtz.r93@gmail.com

RESUMEN

La aplicación de los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) se ha convertido en una alternativa interesante para reducir el uso de la extracción líquido-líquido basada en disolventes orgánicos convencionales, así como otras técnicas de purificación y separación. Es por tal motivo que en las últimas décadas ha sido de gran interés el estudio de estos sistemas ya que la gama de aplicación es amplia, desde la partición de biomoléculas hasta la separación de compuestos inorgánicos. Una de las grandes ventajas de esta técnica es que es amigable con el medio ambiente ya que la composición de las dos fases suele tener un porcentaje mayoritario de agua.

El diclofenaco es un fármaco perteneciente al grupo de antiinflamatorios no esteroideos. Es utilizado como un analgésico de venta libre. Los residuos de este compuesto pueden contaminar aguas o retenerse en el suelo acumulándose en los ecosistemas, afectando así a los seres vivos

En este trabajo de investigación se evaluó la extracción de diclofenaco, a partir de sistemas bifásicos acuosos compuestos por polietilenglicol (PEG-400 y PEG-1000) y sales de sodio (sulfato de sodio y citrato de sodio). Primeramente, se obtuvieron las curvas de solubilidad (curvas binodales) de los diferentes sistemas PEG/sal. Los resultados obtenidos muestran que los sistemas PEG/sal utilizados permiten realizar una recuperación eficiente del diclofenaco (de 82% a 96% dependiendo del sistema). Por otro lado, se propone un mecanismo de extracción del fármaco en base a los espectros obtenidos mediante espectroscopia UV/Vis. Un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda del diclofenaco fue observado, cuando se encuentra en la fase polímero en todos los ATPS, por lo que es posible que se puedan estar formando enlaces de hidrógeno entre el diclofenaco sódico y el PEG, lo cual permite explicar la transferencia del diclofenaco a la fase del PEG.

INTRODUCCIÓN

La generación inconsciente de cantidades inconmensurables de contaminantes ha generado un grupo específico de compuestos los cuales llevan por nombre contaminantes emergentes. Estos agentes se caracterizan principalmente por no estar regulados con alguna normatividad, lo que implica que su presencia en el medio ambiente sea desapercibida y en algunos casos aún se desconoce el impacto ambiental y los efectos nocivos que pueden causar en los seres vivos, ya que este último depende principalmente de la concentración y el tipo de contaminante [1].

Los grandes avances que se han dado en el desarrollo de nuevos métodos analíticos más sensibles han permitido detectar concentraciones a nivel de nanogramos de este tipo de contaminantes en el medio ambiente, por lo que el número de estudios analíticos que reportan la detección de estos agentes a nivel mundial ha ido en aumento, gracias a esto se ha previsto que en un futuro estos compuestos puedan ser contemplados para su regulación [2].

Uno de los contaminantes emergentes que más preocupación ha causado a nivel mundial es el de los fármacos. Anteriormente estos agentes no se consideraban como un contaminante debido a la poca o nula importancia que tenían con respecto a su acumulación en suelos, aguas, tejidos, entre otros, así como la presencia de sus productos biotransformados [3].

El intervalo de consumo de medicamentos en países desarrollados suele ser de 50 a 150 gramos por persona al año, los fármacos que más se utilizan son los antiinflamatorios no esteroideos como ibuprofeno y el diclofenaco, los antipiréticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los betabloqueantes como el metoprolol [2]. Se han logrado detectar concentraciones desde $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [4], siendo esto una preocupación a nivel mundial y convirtiendo así a los fármacos como uno de los principales contaminantes emergentes. Se ha

estimado que se pueden encontrar entre 30 y 60 fármacos sin importar que tipo de cuerpo acuático se trate (aguas superficiales, subterráneas y agua potable) [3].

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de moléculas de estructura química variable, entre los cuales podemos encontrar la aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tolmetin, fenilbutazona, fenoprofeno, indometacina y piroxicam.

Aunque casi todos son ácidos orgánicos, tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, las cuales son mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación, a través de la enzima ciclooxigenasa [4].

El diclofenaco (ácido 2-(2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil)acético) es un fármaco que pertenece al grupo de los AINEs. Tiene una solubilidad en agua (25°C) de $2.37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una constante de disociación (pK_a) de 4.15 [5]. La molécula incluye un grupo fenilacético, una amina secundaria, un grupo fenilo con dos átomos de cloro en posiciones orto a la amina [6], como se observa en la Figura 1.

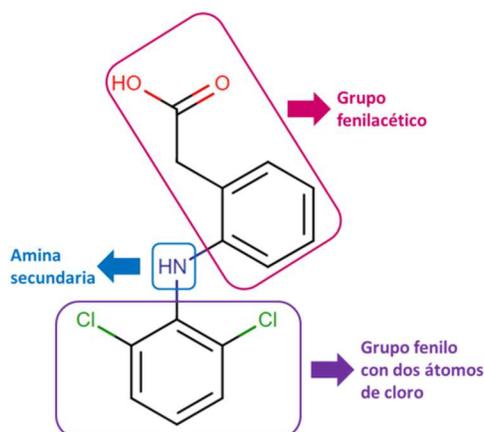


Figura 1. Estructura química del diclofenaco.

Posee actividades analgésicas y antipiréticas, está indicado por vía oral e intramuscular para el tratamiento de enfermedades reumáticas agudas, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artrosis, lumbalgia, gota en fase aguda, inflamación postraumática y postoperatoria, cólico renal y biliar, migraña aguda, y como profilaxis para dolor postoperatorio y dismenorrea [7].

El mecanismo de acción del diclofenaco, como el de otros AINEs, implica la inhibición de las vías de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), también puede estar relacionado con la inhibición de la prostaglandina sintetasa [8].

El diclofenaco puede causar algunos efectos adversos como: diarrea, estreñimiento, flatulencia o distensión abdominal, dolor de cabeza, mareos, zumbido en los oídos, entre otros [8]. La hepatotoxicidad es uno de los efectos secundarios asociados a la administración de diclofenaco [9]. Se estima que en el mundo hay un consumo anual de 940 toneladas de este fármaco [10]. Los efectos de toxicidad se dan a concentraciones menores de los $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [11]. Las fuentes donde más son encontrados este tipo de contaminantes son las aguas superficiales, aguas residuales urbanas, agua de mar, agua potable y aguas subterráneas. La contaminación con diclofenaco está causando un riesgo muy grande para muchos seres vivos, de los cuales ya se tienen identificados algunos en donde este fármaco se ha acumulado en los tejidos o ha provocado hasta la muerte. Una de las problemáticas más populares que se dieron por los efectos de toxicidad del diclofenaco fue en el 2006, cuando en la India [12], Pakistán [13] y Nepal hubo una disminución considerable en la población de buitres a causa de que dichas aves se alimentaban de la carne de ganado que estuvo expuesta a un tratamiento veterinario con este fármaco. Con el tiempo se demostró que la mortalidad de los buitres se debe a la insuficiencia renal causada por el diclofenaco [13]. Otros estudios indican que el diclofenaco también ha llegado a afectar a las águilas esteparias [14], y ha causado estrés oxidativo en la carpa común en México [15]. Por lo que puede predecir que una exposición prolongada puede deteriorar la salud de los seres vivos y de algunos otros que tal vez aún no se tenga conocimiento [16].

La extracción líquido-líquido es una técnica de separación la cual está fundamentada en la transferencia de uno o más compuestos entre dos fases líquidas que son inmiscibles entre ellas. Una de las características principales de dicha extracción es que el sistema se compone por una fase orgánica y una fase acuosa. Los métodos convencionales de esta extracción incluyen el uso de disolventes orgánicos, lo cuales tienen gran desventaja de uso al ser inflamables, volátiles y tóxicos. Por tal razón, se buscan nuevas alternativas que sigan aplicando el fundamento de la extracción líquido-líquido, pero con un menor impacto ambiental [17].

Una alternativa que se ha vuelto muy popular en las últimas décadas ha sido la aplicación de sistemas bifásicos acuosos como técnica de extracción líquido-líquido. Estos sistemas son comúnmente denominados como ATPS (por sus siglas en inglés Aqueous Two-Phase System). Este método se fundamenta en la repartición de moléculas en un sistema conformado por dos fases acuosas. Su descubrimiento se dio en 1896 cuando Martinus Willem Beijerinck encontró un sistema bifásico al mezclar dos soluciones de almidón y grenetina. Sin embargo, su primera aplicación fue descubierta por Per-Åke Albertsson demostrando que existe la repartición de partículas celulares y macromoléculas en este sistema [17]. Desde entonces, los ATPS se han convertido en una técnica de gran uso para la separación de una amplia gama de biomateriales: células vegetales y animales, microorganismos, hongos y sus esporas, virus, cloroplastos, mitocondrias, vesículas de membrana, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos. También su uso se ha extrapolado hasta la separación/recuperación de metales, fármacos, metabolitos, nanomateriales, entre otros [18].

En lo que respecta a los sistemas de extracción de dos fases acuosas, éstos pueden estar formados por dos componentes: 1) sistema polímero-polímero, 2) sistema polímero-sal, 3) sistema alcohol-sal, 4) sistema basado en líquidos iónicos y 5) sistemas micelares [19].

Los sistemas polímero-polímero y polímero-sal tienen grandes ventajas [18] sobre la extracción convencional que utiliza disolventes orgánicos, por ejemplo:

- El mayor porcentaje del sistema está conformado por agua.
- En los ATPS se forma un ambiente suave para trabajar con biomateriales sin que se vea afectada su estructura.
- La tensión interfacial es extremadamente baja (entre 0.0001 y $0.1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) en comparación con los sistemas que usan disolventes orgánicos (1 a $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), creando así un área de contacto interfacial alta cuando las fases están dispersas y, por lo tanto, se puede dar una transferencia de masa eficiente.
- El uso de polímeros como el polietilenglicol (PEG) son de los más utilizados ya que presentan baja toxicidad y volatilidad, así como su bajo precio.
- La técnica de extracción líquido-líquido basada en un ATPS ha demostrado ser altamente efectiva, fácilmente escalable y con un costo de inversión bajo.

En los sistemas basados en polímero/sal/agua, la separación de fases está influenciada por la concentración y el tipo de sal. En muchas ocasiones, una concentración suficientemente alta de sal en un sistema polímero/agua puede inducir la separación de fases, lo que producirá una fase inferior rica en sal y pobre en polímero que coexiste con la fase superior rica en polímero y pobre en sal [18].

El diagrama de fase en los ATPS.

El diagrama de fase delimita el área potencial de trabajo para cada sistema bifásico particular (Figura 1), es la "huella digital" para cada sistema en condiciones establecidas de, por ejemplo, pH, temperatura y concentración de sal.

La información que se puede obtener a partir de dicho diagrama es:

- La concentración de componentes formadores de fase necesaria para formar un sistema con dos fases que están en equilibrio
- La concentración subsiguiente de componentes de fase en las fases superior e inferior
- La relación de volúmenes de fase.

En el diagrama puede observarse una curva binodal, ésta divide el diagrama en dos regiones, por encima de la curva se tendrán las concentraciones de los componentes que formarán dos fases acuosas inmiscibles, por debajo de la curva, aquellas concentraciones que formarán una fase.

El punto donde se tiene un sistema de trabajo estará situado en una línea de enlace, esta línea conecta dos nodos que se encuentran en la curva binodal, estos representan la concentración final de los componentes en las fases superior e inferior. Al moverse sobre la línea de enlace se pueden obtener las concentraciones totales y relaciones de volúmenes diferentes, pero con la misma concentración final de los componentes de las fases superior e inferior. En esta misma curva, también está presente el punto crítico (Cp), justo por encima de éste, la composición y el volumen de ambas fases son casi iguales [18].

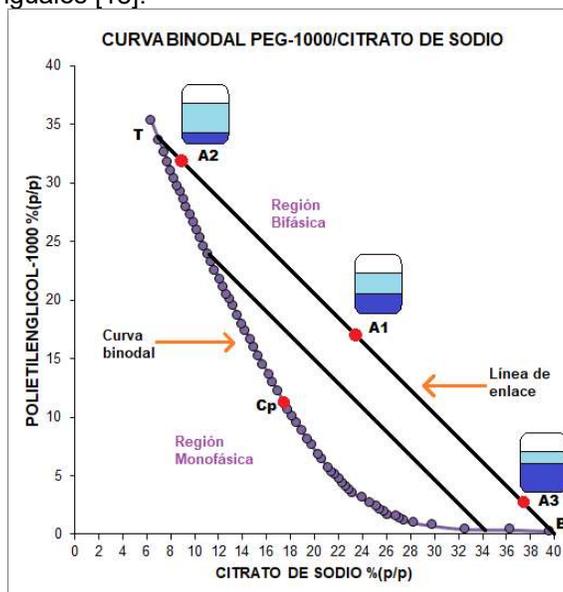


Figura 2. Diagrama de fase en los ATPS.

Aplicaciones de ATPS en extracción de fármacos.

Los ATPS se han convertido en una técnica muy utilizada para la recuperación, separación y concentración de fármacos, por ejemplo, ya se ha extraído Roxitromicina, sulfametoxazol cloranfenicol, ciprofloxacino, sulfonamidas, tetraciclina y oxitetraciclina que están presentes en el agua, alimentos de origen animal y plantas. En los ATPS se tiene la gran ventaja de que es posible extraer analitos directamente en un solo paso. La detección de residuos a una concentración muy baja también es posible con estos sistemas bifásicos[19]

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos.

Todas las soluciones realizadas fueron disueltas con agua desionizada (Marca: Karal). El diclofenaco se adquirió en Sigma-Aldrich como diclofenaco sódico en grado reactivo. Se utilizó como polímero el polietilenglicol $[\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}]$ de pesos moleculares $400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Marcas: Polioles y Karal, respectivamente; grado reactivo). Se utilizaron las sales, citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$) y sulfato de sodio (Na_2SO_4). (Ambos con Pureza: 99%; Marca: Karal; grado reactivo).

Construcción de la curva binodal para la formación de los ATPS por el método de punto de nube.

Se adicionan 5 g de una solución madre del componente X (solución de sal) en un matraz erlenmeyer de 25 mL con un agitador. Se pesa el matraz y el agitador, se añade gota a gota una solución madre del componente Y (solución de polímero) hasta el primer signo de turbidez, es decir, en el punto de nube. Esto proporciona el primer punto en la curva binodal. Agregar un peso conocido de diluyente por debajo del punto de nube (desaparición de la turbidez). Se repite el procedimiento hasta que no exista la formación de turbidez y se realizan los cálculos correspondientes

Preparación de los ATPS.

En un vial, se adiciona el porcentaje correspondiente (para una relación de fases igual a 1) de sal y polímero, dependiendo del sistema a trabajar. Posteriormente se añade porcentaje de agua correspondiente con la presencia del fármaco diclofenaco (10 ppm). Se lleva a agitación el sistema durante 30 minutos a 500 rpm y se deja el sistema en reposo hasta la completa separación de las fases. Una vez formadas las fases, se procede a la cuantificación del fármaco en fase polímero. Este mismo procedimiento se utilizó, con y sin presencia del fármaco, para la posterior caracterización fisicoquímica y por espectroscópica de cada ATPS.

Estudio de la cinética de extracción de diclofenaco para cada ATPS.

A partir de la metodología general para la formación de los ATPS, se realizaron ensayos de extracción del fármaco modificando el tiempo de agitación de cada ATPS. Se variaron los tiempos de agitación en 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutos. Cada ensayo fue agitado en una incubadora de agitación orbital (Marca: Prendo; Modelo INO 650V-7) a 500 rpm a 25 °C. Posteriormente se dejaron separar las fases y se analizó la concentración del diclofenaco en la fase polímero.

Obtención del espectro de absorción del diclofenaco en solución acuosa y fase polímero.

Para la obtención del espectro de absorción del diclofenaco disuelto en agua, se sometió a análisis una solución de 0.01 mg·mL⁻¹ (10 ppm) de dicho fármaco, utilizando como blanco agua desionizada, en un espectrofotómetro UV/Vis (Marca: Varian; Modelo: Cary 5 probe) en un intervalo de longitudes de onda de 200-400 nm, utilizando una celda de cuarzo de 5 mm (Marca: Perkin-Elmer). A partir de lo anterior se determinó la longitud de onda de máxima absorción de 276 nm. Por otro lado, una vez llevado a cabo el proceso de extracción del diclofenaco y que las fases se encontrarán en equilibrio, se realizó la obtención del espectro de absorción del diclofenaco presente en la fase polímero. Se sometió a análisis una muestra de dicha fase en un intervalo de longitudes de onda de 200-400 nm, utilizando una celda de cuarzo de 5 mm y como blanco se utilizó la fase polímero del ATPS correspondiente sin la presencia del fármaco. A partir de lo anterior se determinó la longitud de onda de máxima absorción para el diclofenaco en cada ATPS correspondiente.

Determinación cuantitativa de diclofenaco en solución acuosa.

Se construyó una curva de calibración preparando siete soluciones de diclofenaco disuelto en agua desionizada, utilizando como blanco el agua desionizada. Se midieron las absorbancias de cada solución a la longitud de onda máxima de 276 nm. A partir de la curva de calibración, se determinaron las concentraciones iniciales de diclofenaco (exclusivamente en solución acuosa) para la posterior extracción del fármaco.

Determinación cuantitativa de diclofenaco en fase polímero.

Puesto que en analito se encuentra en un ambiente de PEG/Sal/H₂O, la determinación cuantitativa del diclofenaco en la fase polímero se realizó construyendo una curva de calibración preparando siete soluciones, en donde, se disolvió el fármaco en una solución de concentraciones similares a la fase polímero (PEG, sal y agua desionizada, dependiendo del sistema), utilizando como blanco solución anteriormente mencionada. El porcentaje de extracción del fármaco puede calcularse de la siguiente manera: %Extracción = $([M]_f / [M]_i) \times 100$

Donde $[M]_i$ representa la concentración inicial en la fase salina y $[M]_f$ la concentración final del fármaco en la fase polímero después de la extracción sólo cuando ambos volúmenes son iguales

Determinación de la densidad de las fases para cada ATPS.

La densidad las fases de cada sistema bifásico acuoso propuesto, fue determinada con un equipo de medición de densidad automatizado a una temperatura de 25 °C (Marca: Anton Paar; Modelo: DMA 4500).

Determinación de la viscosidad de las fases para cada ATPS.

La viscosidad de cada una de las fases por cada sistema bifásico acuoso fue determinada con un viscosímetro de Ostwald de talla 200, en un baño de agua a temperatura de 25 °C.

RESULTADOS

Construcción de la curva binodal para cada ATPS.

A partir del método de punto de nube, se obtuvieron las curvas binodales correspondientes a los sistemas: PEG-400/CITRATO DE SODIO, PEG-400/SULFATO DE SODIO, PEG-1000/CITRATO DE SODIO y PEG-1000/SULFATO DE SODIO las cuales se pueden observar en las Figuras 3-6.

Para corroborar que los resultados obtenidos de la construcción de la curva binodal eran correctos, se llevaron a cabo mezclas aleatorias de diferentes porcentajes del polímero PEG y las sales correspondientes, como se puede observar en los puntos verdes y rojos en las Figuras 3-6, de tal forma que con lo anterior se confirma que con las curvas binodales construidas se puede delimitar la diferencia entre las zonas donde si hay formación bifásica, de aquellas donde no.

Como puede observarse en la Figura 7 el comportamiento de la separación de las fases está influenciado, tanto por el tipo y concentración de la sal, así como del peso molecular del polietilenglicol.

Para los sistemas que están conformados por PEG-400 puede observarse claramente que se necesita una concentración de casi el doble de citrato de sodio para lograr la formación bifásica, a comparación con el sulfato de sodio, en donde al utilizar una menor concentración de esta sal ya se puede diferenciar la zona de formación bifásica. El mismo fenómeno ocurre al aumentar el peso molecular del polímero, es decir, al tener PEG-1000.

Una explicación a lo anterior, es que la solubilidad del citrato de sodio ($720 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) es mayor que la del sulfato de sodio ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), esto es un factor importante ya que, recordando que las altas concentraciones de sal tienden a inducir la separación de las fases, en el caso de citrato de sodio, la saturación de sal se dará con una mayor cantidad de éste compuesto y con el sulfato de sodio la saturación se dará con una menor concentración de sal por ser menos soluble en agua.

Para el caso de estas sales, la separación de fases en los sistemas de PEG/sal/agua se puede relacionar con el comportamiento que se da con el grado en que se produce la sustitución de las asociaciones de hidratación $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ por las interacciones PEG-éter oxígeno- Na^+ , esto sucede porque el agua que rodea a los aniones tiende a retener enlaces de hidrógeno $\text{H}_2\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ favorables, mientras que el agua que rodea a los cationes pequeños no, por lo tanto, el citrato³⁻ y SO_4^{2-} se hidratan fuertemente. Las sales con pequeños aniones multivalentes de alta densidad de carga están restringidas por tales interacciones con la cadena de polímeros, lo que conduce a la presencia de zonas agotadas de sal alrededor de los polímeros y la consiguiente formación de fases [18].

Al comparar el empleo de dos polímeros de diferente peso molecular (ver Figura 7), se puede observar que se necesita de una menor concentración de polímero de mayor peso molecular (PEG-1000) para poder diferenciar la zona bifásica. Cabe mencionar que ambas curvas con PEG-1000 presentan una mayor concavidad. Lo anterior ocurre debido a que las interacciones con el agua aumentan dependiendo del tamaño de las moléculas y por tal razón la separación de fase se produce cuando la concentración de polímero es menor debido al gran tamaño del PEG-1000. Aunado a esto, cuando el peso molecular del polímero aumenta, la hidrofobicidad es mayor y la solubilidad en agua es menor [20].

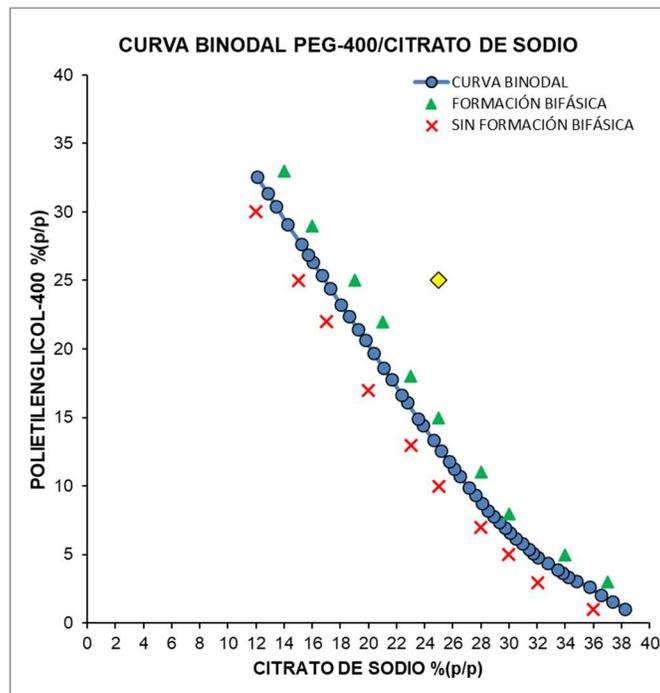


Figura 3. Curva binodal PEG-400/Citrato de sodio, zonas de formación bifásica y punto de relación de fases igual a uno (amarillo).

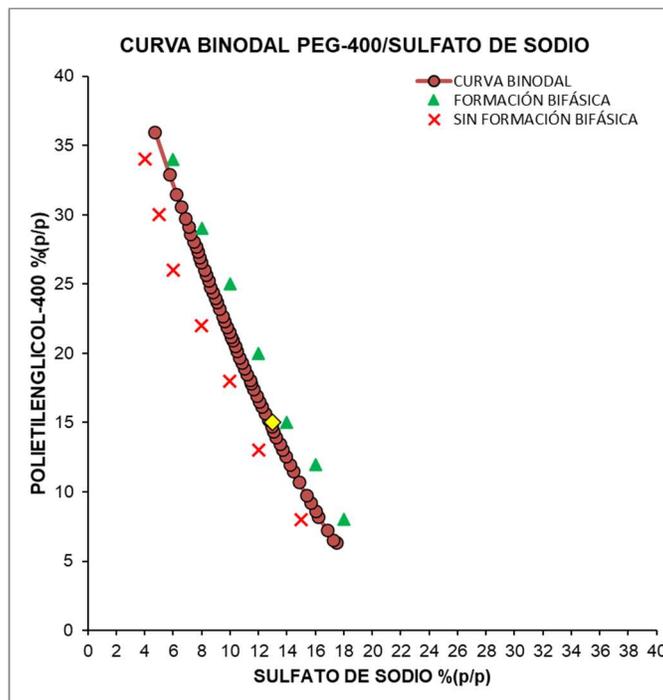


Figura 4. Curva binodal PEG-400/Sulfato de sodio, zonas de formación bifásica y punto de relación de fases igual a uno (amarillo).

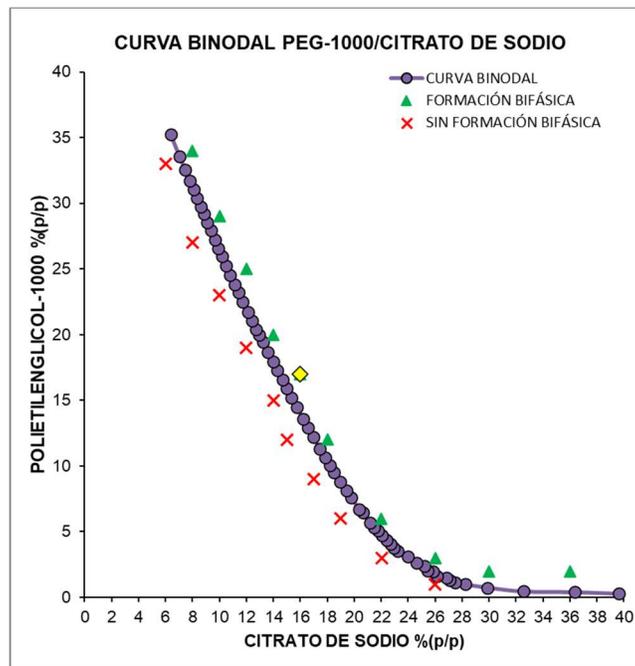


Figura 5. Curva binodal PEG-1000/Citrato de sodio, zonas de formación bifásica y punto de relación de fases igual a uno (amarillo).

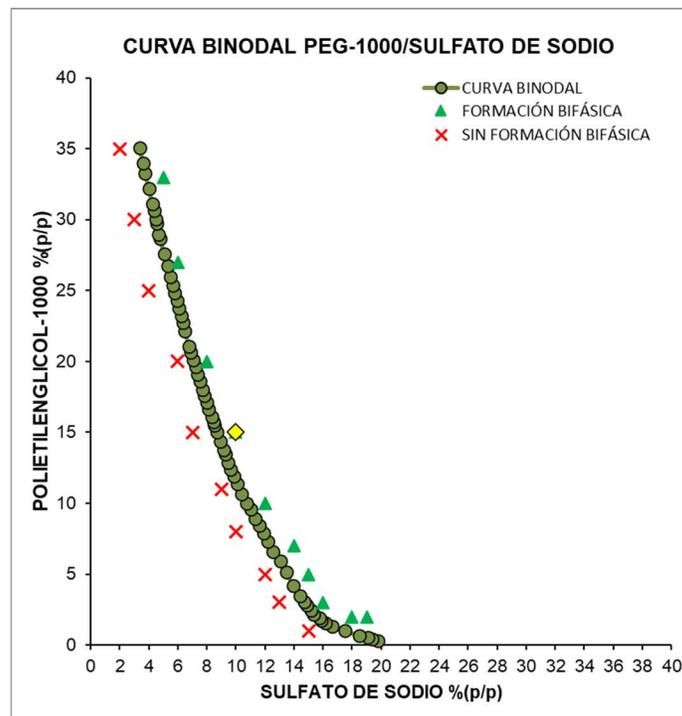


Figura 6. Curva binodal PEG-1000/Sulfato de sodio, zonas de formación bifásica y punto de relación de fases igual a uno (amarillo).

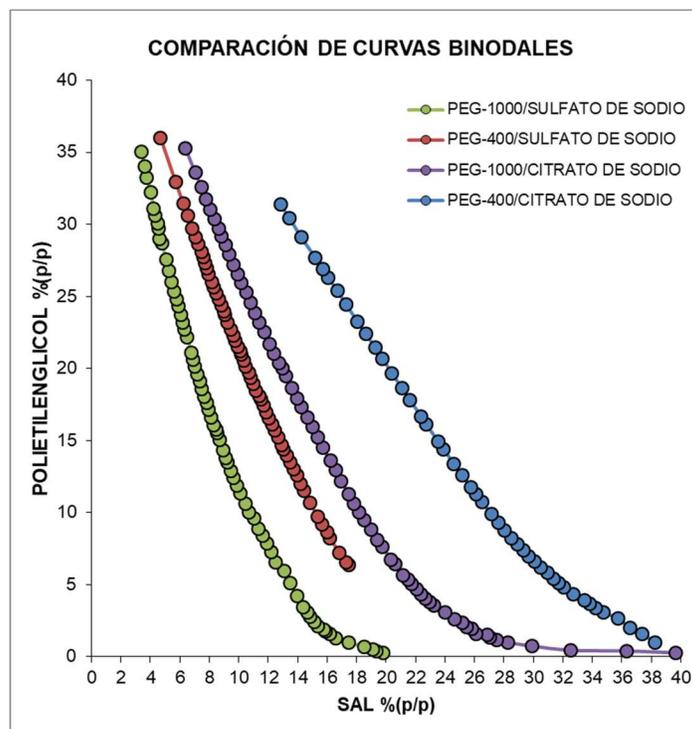


Figura 7. Comparación de las curvas binodales determinada.

Cinética de extracción de diclofenaco.

En la Figura 8 se muestra de manera gráfica la cinética de extracción del diclofenaco sódico en cada ATPS. Todos los sistemas presentan una extracción máxima a cierto tiempo de agitación, para el sistema PEG-400/CITRATO DE SODIO, a los 8 minutos se logra tener un porcentaje máximo de extracción del 93.11%, para PEG-400/SULFATO DE SODIO, la extracción máxima se da a los 10 minutos con un porcentaje de recuperación del fármaco y por último, para el sistema PEG-1000/SULFATO DE SODIO, se tiene un porcentaje máximo de recuperación de 96.09% a los 8 minutos de agitación. En todos los casos, después de los tiempos de máxima extracción del fármaco, la recuperación se mantiene constante.

Comparando los sistemas conformados por PEG-400/CITRATO DE SODIO y PEG-400/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el tipo de sal, el citrato de sodio tiene mayor influencia en la transferencia del diclofenaco sódico a la fase polímero, que comparación con el sulfato de sodio. Esto puede estar relacionado a su vez con la serie de Hofmeister porque los aniones con mayor densidad de carga y valencia se hidratan más fuertemente, lo que conduce en una reducción de la cantidad de agua disponible para que el polietilenglicol permanezca hidratado. Cuando lo anterior sucede, se excluyen los componentes diferentes a las sales, es decir, el polietilenglicol en este caso, y si éste último forma a su vez complejos con el diclofenaco de sodio (mecanismo descrito más adelante), entonces se forma la fase polímero con la presencia del fármaco.

Si se comparan los sistemas conformados por PEG-400/SULFATO DE SODIO y PEG-1000/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el peso molecular del polímero y tomando en cuenta la Figura 7, la hidrofobicidad del PEG aumenta con los pesos moleculares, por lo tanto, la región bifásica es mayor a medida que aumenta el peso molecular del polímero. Los motivos por los cuales el reparto del soluto aumenta con el peso molecular pueden ser: 1) El PEG-1000 es más hidrófobo que PEG-400 causando así que la diferencia de hidrofobicidad entre las fases superior e inferior aumente y esto conduzca a un mayor valor del coeficiente de partición y 2) una vez que los sistemas se encuentran en equilibrio, en PEG-1000/SULFATO DE SODIO, la fracción en peso de polímero es menor en la fase salina que en PEG-400/SULFATO DE SODIO, lo que da como

resultado menos interacciones con el diclofenaco en la fase salina y aumente el porcentaje de recuperación.

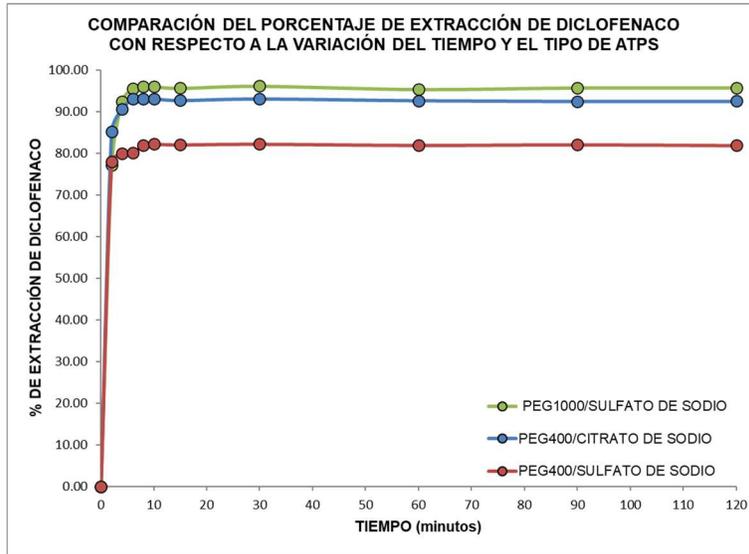


Figura 8. Comparación del porcentaje de extracción de diclofenaco con respecto a la variación del tiempo y el tipo de ATPS.

Determinación de propiedades fisicoquímicas de cada ATPS: Densidad y viscosidad.

Como puede observarse en la Figura 9, en todos los casos la fase polímero tiene menor densidad que la fase salina en cada uno de los sistemas. Comparando los sistemas conformados por PEG-400/CITRATO DE SODIO y PEG-400/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el tipo de sal, el que se encuentra conformado por PEG-400/CITRATO DE SODIO tiene la mayor densidad en ambas fases, esto se debe a la gran concentración de sal y polímero que se requiere para la formación de las fases en este sistema. Si se comparan los sistemas conformados por PEG-400/SULFATO DE SODIO y PEG-1000/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el peso molecular del polímero, el sistema con menor densidad tanto en fase polímero como fase salina es el de PEG-1000/SULFATO DE SODIO y puede inferirse que es causado por tener la menor concentración de sal y polímero que se necesita para la formación de fases.

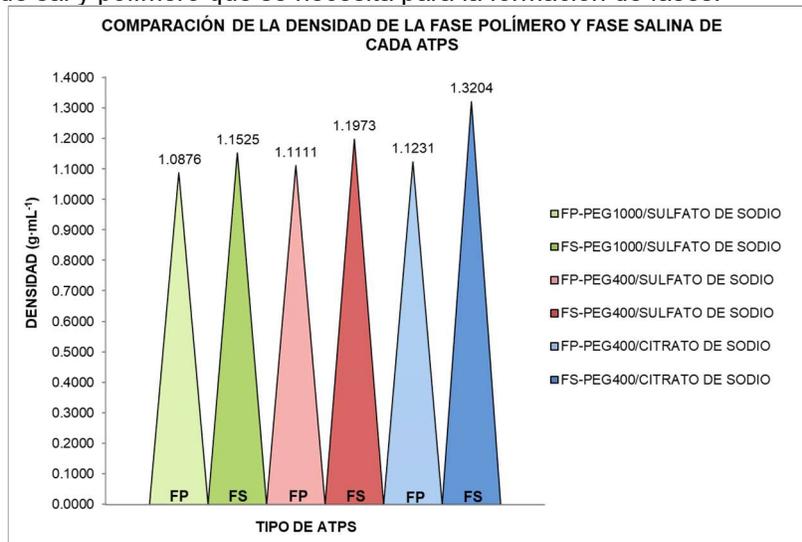


Figura 9. Comparación de la densidad de la fase polímero (FP) y la fase salina (FS) de cada ATPS.

Con respecto a la viscosidad dinámica, la cual implica la medición de la resistencia interna del fluido al flujo, puede observarse en la Figura 10 que en todos los casos la fase salina tiene la menor viscosidad que en comparación de la fase polímero. Para los sistemas conformados por PEG-400/CITRATO DE SODIO y PEG-400/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el tipo de sal, el que se encuentra conformado por PEG-400/CITRATO DE SODIO tiene la mayor viscosidad en ambas fases, esto se debe a que este sistema contiene una alta concentración de sal y polímero requeridos para inducir la formación de las fases. Si se comparan los sistemas conformados por PEG-400/SULFATO DE SODIO y PEG-1000/SULFATO DE SODIO en donde se ve modificado el peso molecular del PEG, el sistema con mayor viscosidad en la fase polímero es el de PEG-1000/SULFATO DE SODIO, esto se debe a que, a pesar de tener una menor concentración de polímero, la forma física del PEG-1000 es sólida, por lo que al disolverse en agua puede conferirle una mayor viscosidad a la fase superior. Por otro lado, el sistema con mayor viscosidad en la fase salina es el de PEG-400/SULFATO DE SODIO esto se debe a que el sistema contiene una mayor concentración de sal.

La viscosidad cinemática relaciona la viscosidad dinámica y la densidad, como puede observarse en la Figura 11, ocurre el mismo comportamiento que se ha descrito anteriormente para la viscosidad dinámica en todos los casos.

La diferencia entre determinar la viscosidad dinámica y cinemática radica en que la primera da información sobre la fuerza necesaria para que el fluido fluya a una velocidad determinada, mientras que la segunda indica qué tan rápido se mueve el fluido cuando se aplica una determinada fuerza.

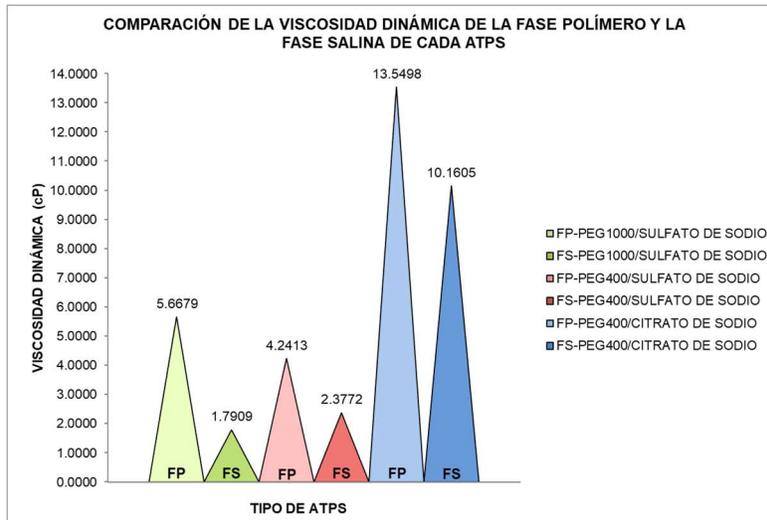


Figura 10. Comparación de la viscosidad dinámica de la fase polímero (FP) y la fase salina (FS) de cada ATPS.

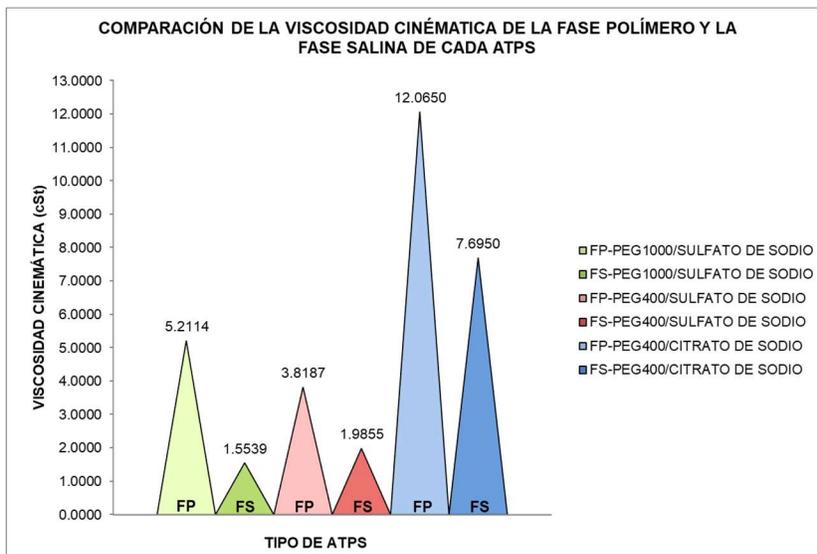


Figura 11. Comparación de la viscosidad cinemática de la fase polímero (FP) y la fase salina (FS) de cada ATPS.

Análisis por espectroscopia UV/Vis de las interacciones del diclofenaco en cada ATPS.

Los espectros de espectroscopia UV-VIS del diclofenaco extraído en cada una de las ATPS estudiadas se muestran en la Figura 12, en donde también se ha representado el espectro del diclofenaco en fase acuosa.

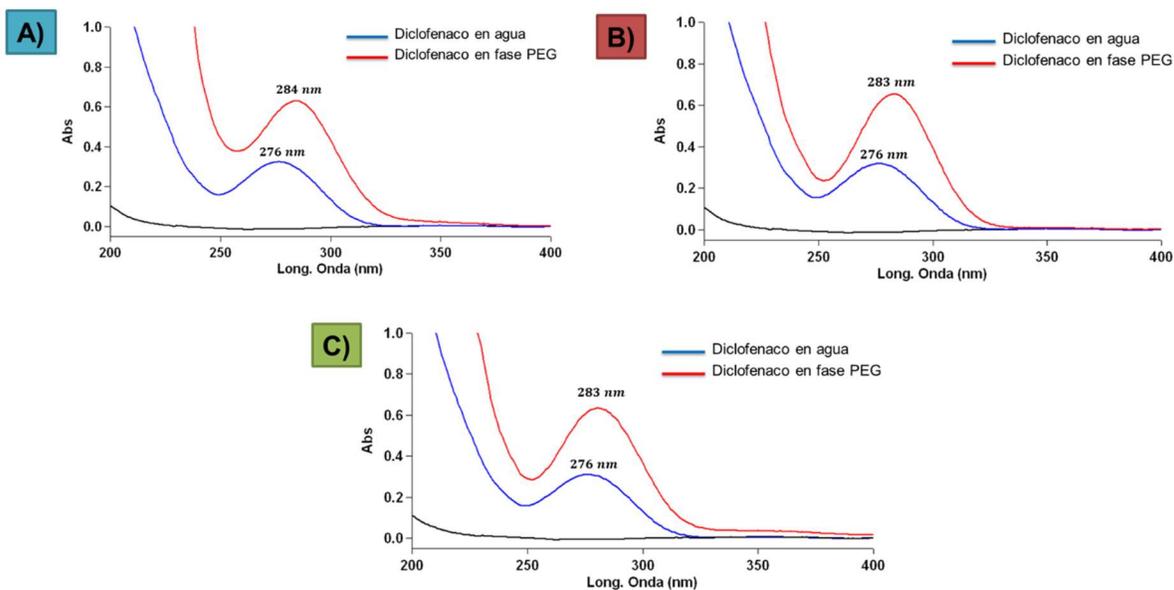


Figura 12. Comparación de los espectros UV-Vis del diclofenaco recuperado en la fase polímero de cada ATPS A) PEG-400/CITRATO DE SODIO, B) PEG-400/SULFATO DE SODIO y C) PEG-1000/SULFATO DE SODIO.

Se puede observar que en fase acuosa el diclofenaco muestra un pico de máxima absorción a 276 nm, en tanto que en fase de PEG el pico máximo es de 284 nm, 283 nm y 283 nm para cada una de las ATPS estudiadas. Es interesante señalar que en todos los ATPS el pico de máxima absorción del diclofenaco en fase de PEG muestra un efecto batocrómico (se desplaza hacia la derecha con

respecto al pico observado en fase acuosa). Este efecto también es conocido como desplazamiento hacia el rojo [21]. Por otro lado, también se puede observar que existe un incremento en el valor de la absorbancia del diclofenaco cuando se encuentra en la fase del PEG, con respecto al obtenido en medio acuoso. El cambio en el valor máximo de absorción, así como el incremento en la absorbancia, es probablemente causado por enlaces de hidrogeno formados entre el diclofenaco y el PEG [22]. Es importante mencionar que el PEG tienen una amplia variedad de mezclas derivadas de su estructura debido a sus grupos hidroxilo primarios terminales que son fácilmente enlazables en combinación con muchos compuestos y complejos posibles tales como éteres, ácidos grasos, aminas, propilenglicoles, entre otros derivados [23].

En el diclofenaco sódico, el sodio que se encuentra en el grupo fenilacético es fácilmente dissociable, y debido a que el pH tanto de la fase acuosa como de la fase de PEG es superior al pKa del diclofenaco, lo que conlleva a que el átomo de hidrógeno del éter fuera de la cadena, en el PEG, forme un enlace de hidrogeno con el átomo de oxígeno con carga negativa del diclofenaco. Al formarse este enlace se produce una redistribución de electrones dentro de las moléculas de diclofenaco y por lo tanto hay una reducción de energía que hará disminuir la radiación absorbida y por lo tanto aumentará la longitud de onda del espectro tal y como se observa en todos los casos. Por la estructura del diclofenaco, se puede inferir que el grupo fenilacético es quien le confiere la característica de compuesto cromóforo [21] al contener el carbonilo y el oxígeno sin pares enlazados. Por lo que al distribuirse los electrones se ve directamente afectado este grupo y por tal razón hay un cambio en la longitud de onda de absorción.

Lo anteriormente expuesto se muestra de manera gráfica en la Figura 13. El contraion del diclofenaco, el Na^+ , pasa a la fase del PEG por medio de la interacción del oxígeno del eter terminal, lo cual asegura la neutralización de las cargas en la fase del PEG.

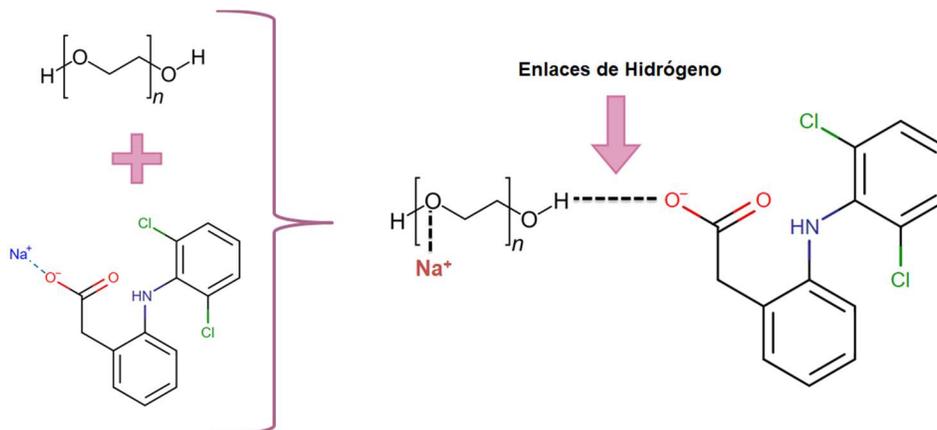


Figura 13. Propuesta de la formación de enlaces de hidrógeno entre el PEG y el diclofenaco a partir de las interacciones observadas en espectroscopia U V/Vis.

CONCLUSIONES

Mediante los diagramas de fase se observó la influencia que tiene el peso molecular del PEG y el tipo de sal para delimitar la zona de formación bifásica; entre mayor es el peso molecular del PEG, más grande es la zona bifásica. Por otro lado, los aniones de las sales de sodio también influyen en el tamaño de dicha zona.

En el estudio de la cinética de extracción del diclofenaco, se observó que para todos los ATPS la cinética fue rápida (8 o 10 minutos para la extracción máxima). En PEG-400/CITRATO DE SODIO se obtuvo un porcentaje máximo de extracción del 93.11%. Para PEG-400/SULFATO DE SODIO fue de 82.12% de recuperación del fármaco. Por último, para el sistema PEG-1000/SULFATO DE SODIO, se tiene un porcentaje máximo de recuperación de 96.09%. En todos los casos, después de los tiempos de máxima extracción del fármaco, la recuperación se mantiene constante y antes de estos tiempos máximos la sal no se encuentra completamente disuelta por lo que su concentración es un factor importante en la transferencia del soluto hacia la fase polímero. De manera particular,

cuando se modifica el tipo de sal y se mantiene el mismo peso molecular del PEG, la extracción sigue el orden de la serie de Hofmeister en donde, los aniones con mayor densidad de carga y valencia se hidratan más fuertemente causando así una mayor exclusión del polímero y el fármaco. Por otro lado, cuando se modifica el peso molecular y se mantiene el mismo tipo de sal se observa que al aumentar el peso molecular, la hidrofobicidad es mayor y una vez que los sistemas se encuentran en equilibrio la fracción en peso de polímero es menor en la fase salina lo que da como resultado menos interacciones con el diclofenaco en la fase salina y aumente el porcentaje de recuperación.

El pH es un factor importante en la transferencia de masa del diclofenaco hacia la fase polímero, ya que puede alterar la carga y las propiedades superficiales del soluto. Se tiene una mayor recuperación para el sistema PEG-400/CITRATO DE SODIO debido a que su pH es mayor comparándolo con PEG-400/SULFATO DE SODIO. Debido a que el pH en ambas fases fue superior al pKa del diclofenaco, la especie aniónica del diclofenaco es la que predomina, lo cual justifica que el porcentaje de extracción sea alto a los valores de pH estudiados.

Los datos de densidad y viscosidad, de manera general, se relacionan principalmente con la concentración del polímero y sal. Sin embargo, también se puede ver afectada la viscosidad al utilizar un polímero de mayor peso molecular ya que sus propiedades físicas se van modificando conforme aumenta el peso molecular.

Se demostró por espectroscopia UV/Vis que el aplicar estos ATPS no afecta la naturaleza estructural del diclofenaco una vez que este pasa a la fase polímero, por otro lado, mediante los espectros UV se pudo determinar la posible formación de enlaces de hidrógeno entre el PEG y el diclofenaco, se propone un posible mecanismo de extracción el cual debe de ser confirmado por estudios complementarios.

Este estudio demostró que el uso de los ATPS conformados por los polímeros PEG-400 y PEG-1000 y por las sales citrato de sodio y sulfato de sodio, son una excelente alternativa para la recuperación de diclofenaco. Este método de recuperación resulta ser sencillo y amigable con el ambiente ya que el PEG es un compuesto que presente toxicidad muy baja y la mayor parte del sistema está conformado por agua.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción más limpia*, 7(2), 52-73.
2. Barceló, L., & López de Alda, M. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona), Barcelona.
3. Quesada Peñate, I., Jáuregui Haza, U., Wilhelm, A., & Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 70(3).
4. Santibañez Villegas, S. (2014). Determinación de la cinética de degradación de diclofenaco, ibuprofeno y su mezcla, a temperatura ambiente. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México.
5. PubChem. (s.f.). Diclofenac PubChem. Recuperado el Marzo de 2020, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diclofenac#section=Chemical-and-Physical-Properties>
6. Herman Hernández, E. (Marzo de 2004). Estudio de la capacidad coordinante del diclofenaco sódico {[2-[(2, 6-Diclorofenil) Amino] Fenilato] de Sodio} y los iones contaminantes Pb(II), Cd(II), Zn(II) y Mn(II). Cholula, Puebla, México. Obtenido de http://caterina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/herman_h_e/capitulo2.pdf
7. US. National Library of Medicine. (s.f.). Diclofenac. Recuperado el Marzo de 2020, de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a689002-es.html>
8. Abadi, A., Eissa, A., & Hassan, G. (2003). Synthesis of novel 1, 3, 4-trisubstituted pyrazole derivatives and their evaluation as antitumor and antiangiogenic agents. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(7), 838-844.

9. Gómez-Lechón, M., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Jover, R., & Castell, J. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 17(5-6), 675-680.
10. Zhang, Y., Uwe-Geiben, S., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161.
11. Lara Pérez, M., Leyva Ramos, E., & Moctezuma Velazquez, E. (2017). Degradación Fotocatalítica de Diclofenaco. Colección de memorias de los congresos de la Sociedad Química de México, 93-95.
12. Taggart, M., Senacha, K., Green, R., Jhala, Y., Raghavan, B., Rahmani, A., & Meharg, A. (2007). Diclofenac residues in carcasses of domestic ungulates available to vultures in India. *Environment International*, 33(6), 759-765.
13. Oaks, L. J., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., y otros (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630-633.
14. Sharma, A., Saini, M., Singh, S., Prakash, V., Das, A., Dasan, R., Pandey, S., Bohara, D., Galligan, T. H., Green, R. E., Knopp, D., Cuthbert, R. J. (2014). Diclofenac is toxic to the Steppe Eagle *Aquila nipalensis*: widening the diversity of raptors threatened by NSAID misuse in South Asia. *Bird Conservation International*, 24(3), 282-286.
15. SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. (2013). Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(9), 1689.
16. Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150.
17. Martínez Rodríguez, D. E. (2018). Estudio de la extracción de diclofenaco por medio de un sistema bifásico acuoso. Tesis Licenciatura. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Guanajuato, México.
18. Hatti-Kaul, R. (2000). *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*. Lund, Sweden: Humana-Press.
19. Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M., Hussain, H., Ahmed, S., Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18, 18.
20. Wysoczanska, K., & Macedo, E. (2016). Influence of the Molecular Weight of PEG on the Polymer/Salt Phase Diagrams of Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 61(12), 4229-4235.
21. Amézquita López, F. (2015). *Fundamentos de espectroscopía aplicada a la instrumentación química*. Guanajuato, Guanajuato, México: STOCK.
22. Li, L., Liu, F., Kong, X., Su, S., & Li, K. (2002). Investigation of a liquid-liquid extraction system based on non-ionic surfactant-salt-H₂O and mechanism of drug extraction. *Analytica Chimica Acta*, 2(11), 321-328.
23. Jang, H., Shin, C., & Kim, K. (2015). Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use. *Toxicological Research*, 31(2), 105-136.

ABUNDANCIA DE ÁCAROS EDÁFICOS EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN EL CERRO DEL ÁGUILA

Mayra Silva Corona, Juan Carlos González Cortés, María Elena Granados García, María Alcalá de Jesús y Carlos Alberto Ramírez Mandujano

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
silcor_0322@hotmail.com

RESUMEN

Los ácaros son un grupo muy diverso representantes de la mesofauna del suelo, las comunidades de los ácaros son de gran importancia biológica ya que se ha demostrado en investigaciones recientes que pueden ser bioindicadores de las condiciones del suelo, considerando que sus funciones son fundamentales para el reciclaje de nutrientes y por tanto de la fertilidad. No obstante son muy pocos los trabajos de ácaros edáficos, ya que en su mayoría se estudian aquellos de interés médico y económico. El objetivo de este trabajo fue determinar el comportamiento de la abundancia de ácaros en la época de estiaje (abril), en un gradiente altitudinal en el cerro del Águila (municipio de Morelia, Mich.). El muestreo se realizó a cada 50 metros de los 2050 a 2600 msnm. En cada punto, en un transepto de 50 m perpendicular a la pendiente, se tomaron 5 submuestras (una cada 10 m) y se homogenizaron para obtener una muestra compuesta por sitio. La extracción se realizó utilizando el método de Berlese (modificado) y por flotación con sulfato de magnesio, utilizando 400 g de suelo y preservados en alcohol al 70%. Los organismos se montaron en laminillas con líquido de Hoyer y Balsamo de Canada en Xilol, para su identificación. Los resultados mostraron variación en las abundancias, siendo la altitud de 2,550 m en la cual se presenta la mayor abundancia (37) y a 2,100 m donde se obtuvo menor abundancia (3). Las abundancias mostraron correlación con la altitud, vegetación y uso de suelo. Se encontraron un total de 216 ácaros, lo cual puede estar determinado por la época del año. Adicionalmente, durante el proceso de extracción se observaron nematodos y colémbolos.

INTRODUCCIÓN

Los artrópodos del suelo son de vital importancia en los procesos de descomposición de la materia orgánica ya que participan en ellos de distintas maneras como desintegrar tejidos animales y vegetales dejándolos disponibles a microorganismos como bacterias y hongos, así como también regulan el proceso de mineralización y humificación, evitando la fuga de materia orgánica y nutrientes (Vargas-Palacios *et al.*, 2009), muchos de los grupos funcionan como bioindicadores de la estabilidad y la fertilidad del medio edáfico, ya que son muy sensibles a los cambios climáticos y a las perturbaciones antrópicas, lo que provoca variaciones en su densidad y diversidad (Scheu, 2002; Socarrás y Robaina, 2011), entre ellos se destacan los ácaros y los colémbolos, por ser los principales representantes de este tipo de fauna y por poseer mejores condiciones para ser utilizados con este fin (Socarrás, 2013).

Los ácaros edáficos son artrópodos que miden en promedio de 300 a 700 μm otros pocos exceden los 4mm, representan el grupo de quelicerados más rico en especies y más abundante (Vargas-Palacios *et al.*, 2009).

Los ácaros son animales del *phylum* Arthropoda, *subphylum* *Quelicerata*, pertenecientes a la clase Aracnida, subclase Acari. La teoría de que es un grupo monofilético ha dominado (Lindquist, 1984; Evans, 1992). Se consideran tres superórdenes: Opilioacariformes, Acariformes, con dos divisiones: los Sarcoptiformes (Oribatida y Astigmata) y los Trombidiformes (Prostigmata) y un suborden Endostigmata y los Parasitiformes (con los órdenes Ixodida Holothyrida y Mesostigmata) (Vargas-Sandova, 2019).

El orden Oribatida, son facilitadores de la descomposición de la materia orgánica en interacción con la microflora, debido a que actúan sobre los restos de los animales y las plantas, fragmentándolos y haciéndolos más accesibles a la acción de los microorganismos (Socarras, 2013), este grupo es uno de los más comunes en el suelo ya que son exclusivamente de él, aunque se han reportado sobre roedores y plantas. El orden Mesostigmata tiene representantes importantes como la familia

Uropodidae que junto a los oribátidos, se reportan como indicadores de suelos con alta productividad, esta familia conforma un grupo de ácaros saprófagos, que abundan poco en el suelo ya que presentan características morfológicas y bioecológicas que los hacen muy exigentes en cuanto a la calidad del hábitat (Socarras, 2013). Los Astigmata son un Orden de ácaros que pertenecen al grupo trófico de los fungívoros, han llegado a ser considerados buenos indicadores edáficos ya que estos logran sobrevivir aun cuando el suelo haya sido perturbado (Andrés, 1990).

El Orden prostigmata se caracteriza por que son dominantes de suelos pobres en nutrientes y con bajos valores de carbonato de calcio, bajo contenido de materia orgánica y poca humedad (Socarras, 2013).

Actualmente para el Estado de Michoacán los estudios sobre ácaros edáficos son escasos, puesto que no se ha apreciado su importancia ecológica como uno de los indicadores biológicos del estado del suelo de gran importancia.

ANTECEDENTES

Los ácaros ocupan el segundo lugar después de los insectos, como los organismos mejor representados en el mundo, ya que presentan una gran diversidad y abundancia en cada uno de sus grupos, debido a que tienen una excelente capacidad para habitar cualquier ambiente que les proporcione vida, aun si estos tienen condiciones extremas, sus formas y tamaños dependerán tanto del hábitat como del hábito alimenticio al que estén sometidos (Iraola, 2001).

El orden Oribatida, es representado por especies de vida libre que habitan principalmente en el suelo, en México está conformado por 105 familias con 251 géneros y 435 especies, lo que representa solo el 4.2% de la riqueza mundial (Pérez *et al.*, 2014).

Estudios sobre ácaros Mesostigmata en un bosque de hayas y abetos en España, encontraron que este grupo depende mucho de la humedad relativa del suelo, ya que la mayor parte de las estaciones el hayedo permanece húmedo o saturado de humedad, esto proporciona un ambiente favorable a la comunidad de microorganismos que se encuentran en el suelo, debido a lo anterior se pudo notar una mayor diversidad y abundancia comparando con otros organismos (Moraza, 2007).

Se realizó un estudio en seis sistemas de uso del suelo en Obonuco, Pasto (Nariño) Colombia, los sitios fueron un arreglo silvopastoril, un cultivo de papa en rotación con pastos, un cultivo de papa, un banco de proteína de especies forrajeras, lote de tres pastos en mezcla con trébol y un bosque secundario. Se encontraron 9 familias de Oribatidos, siendo los más abundantes; Mochlozetidae seguida por Oppidae y Ceratozetidae. También se encontraron diferencias significativas entre los diferentes usos del suelo. El sistema donde se presentó la mayor abundancia y diversidad fue el bosque secundario con 17760 ácaros/m², con predominancia de la familia Mochlozetidae en un 53,2%. La menor abundancia se encontró en el sistema papa con 1584 individuos/m², siendo la misma familia la más abundante. Los resultados obtenidos corroboran que la introducción de cultivos y técnicas agrícolas y pecuarias en el medio edáfico, supone una importante perturbación de las comunidades de los ácaros Oribátidos (Genoy *et al.*, 2013).

PARTE EXPERIMENTAL

El área de estudio fue en el municipio de Morelia, Mich. En el cerro del Águila, de la comunidad de Joyas de la huerta, los sitios de muestreo fueron seleccionados utilizando las curvas de nivel de las cartas topográficas E14A23 Morelia y E14A22 Patzcuaro (INEGI, 1998). El muestreo se realizó en el mes de abril de 2019 (época de estiaje), haciendo un recorrido de los 2050 a 2600 m de altitud.

En cada punto de altitud definida se hizo un transepto de 50 m, perpendicular a la pendiente con puntos de muestreo a cada 10 m, del cual se obtuvo una muestra compuesta con 5 submuestras por cada punto altitudinal, teniendo un total de 12 puntos.

Las muestras colectadas fueron sometidas a dos pruebas de extracción de ácaros: por el Embudo de Berlese (modificado) y flotación con sulfato de magnesio.

Para la extracción utilizando el Embudo de Berlese, se pesaron 400 g de suelo, los cuales se colocaron sobre una malla en el embudo para reducir la pérdida del suelo hacia el recipiente colector.

El conservador que se utilizó fue anticongelante, porque no se evapora al contrario que el alcohol al 70°, ya que las muestras de suelo se dejaron durante 15 días, expuestas a la luz.

Los embudos fueron elaborados con garrafas de agua de 10 L y en el cuello del embudo se colocó una malla de tela (tul). Después de la boca del embudo se le colocó un pequeño frasco de vidrio con el conservado, para recibir los organismos que salieran del suelo.

A los 15 días se recuperó el suelo sobrante para pasarlo por el método de flotación con sulfato de magnesio, utilizando porciones de 50 g de suelo a los que se les agregó 150 ml de sulfato de magnesio más 50 ml de agua de la llave, se agitaron durante 5 minutos y se dejaron reposar por 30 a 40 minutos. El sobrenadante se pasó por un tamiz de 244 μm , el cual se enjuago con alcohol al 70° y se recuperó en un frasco de 150 ml para preservar los especímenes. Los ácaros fueron extraídos del conservador y montados en laminillas con líquido de Hoyer (semipermanente) y Bálsamo de Canada en xilol (permanente, pero solo viable para ácaros esclerosados).

RESULTADOS

Método de Berlese (Modificado).

Los resultados mostraron diferencias marcadas en la abundancia, ya que, del total de 216 ácaros extraídos del suelo, con este método se obtuvo un total de 90 ácaros, esto es, el 41.66% de la abundancia total. La altitud en la que se presentó una mayor abundancia por este método fue a los 2,450 m con un total de 15 ácaros, el sitio se caracterizó por suelo cubierto de hojarasca de encino y arbustos de mediano tamaño, con una cobertura arbórea de aproximadamente un 50%. La altitud con menor abundancia fue a 2,100 m con un total de 2 ácaros, en este sitio se cultiva maíz de temporal y es fertilizado con estiércol de vaca, la vegetación es casi nula.

Método de Flotación en MgSO_4

Con el método de Flotación con sulfato de magnesio, se pudo extraer un total de 126 ácaros, es decir, el 58.34% de la abundancia total. El sitio en el que se presentó mayor abundancia fue a 2,550 m con un total de 24 ácaros y por el contrario los sitios con menor abundancia fueron los de 2,150 y 2,100 m, con un solo ácaro.

Comparación de abundancias entre métodos.

En el cuadro 1, se muestran las abundancias absolutas y relativas obtenidas por cada uno de los métodos utilizados.

Sitios de muestreo	Método de Berlese (modificado)		Método de flotación en MgSO ₄		Total	
	Número de individuos	%	Número de individuos	%	Total individuos/sitio	% Total por sitio
2600	7	3.24	11	5.09	18	8.33
2550	13	6.01	24	11.11	37	17.12
2500	12	5.55	21	9.72	33	15.27
2450	15	6.94	13	6.01	28	12.96
2400	8	3.7	11	5.09	19	8.79
2350	3	1.38	7	3.24	10	4.62
2300	11	5.09	4	1.85	15	6.94
2250	5	2.31	14	6.48	19	8.79
2200	5	2.31	8	3.7	13	6.01
2150	3	1.38	1	0.46	4	1.85
2100	2	0.92	1	0.46	3	1.38
2050	6	2.77	11	5.09	17	7.87
TOTAL	90	41.66%	126	58.33%	216	100%

Grupos representativos de los ácaros

Se lograron encontrar ácaros de los diferentes grupos más comunes del suelo, como son los de Orden Oribatida, Mesostigmata, Astigmata y Prostigmata.

Los sitios con mayor abundancias resultaron ser los puntos de mayor altitud y se puede atribuir a las condiciones de mejor conservación del suelo y del entorno general del hábitat: con buena cobertura arbórea, herbácea y cobertura del suelo.

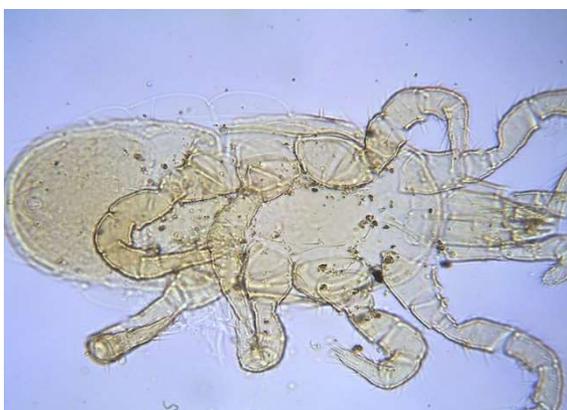


Figura 4. Ácaros del Orden Mesostigmata, por el Método de Flotación, con sulfato de magnesio, vistas ventrales.

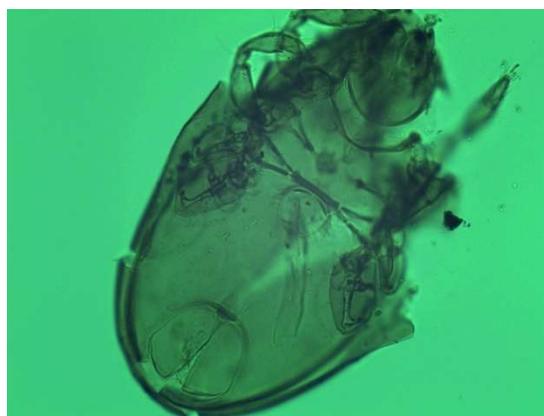


Figura 5. Ácaro Oribatido, vista ventral y dorsal, por el Método de Berlese.



Figura 6. Orden Astigmata, larva Hipopus, por el Método de Berlese.



Figura 4. Orden Prostigmata, por el Método de Flotación.

CONCLUSIONES

Se encontró variación en las abundancias, siendo la altitud de 2,550 m en la cual se presentan más individuos (37) y en la de 2,100 m donde se obtuvo solo 3 ejemplares. Las abundancias pudieron estar influenciadas por la época (estiaje-lluvias), las condiciones del hábitat (suelo-cubierta vegetal) y climáticas (altitud-temperatura).

Los métodos por los que fueron extraídos los ácaros resultaron ser adecuados, aunque el método de flotación en este caso con sulfato de magnesio fue más eficiente. No obstante, es recomendable una combinación de ambos métodos ya que ello asegura la extracción del mayor número de individuos y especímenes del suelo.

Durante el proceso de extracción se observaron nematodos y colémbolos, por lo que podrían ser métodos alternativos para otros grupos de micro y mesofauna edáfica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrés, P. (1990). Descomposición de la materia orgánica en dos ecosistemas forestales del macizo del Montseny (Barcelona): papel de los ácaros oribátidos (Acarina, Oribatei). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 237 p.
2. Genoy, Y. M., Castillo, J.A., & Bacca, T. (2013). Ácaros oribátidos presentes en seis sistemas de uso del suelo en Obonuco, Pasto (Nariño). Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas, 17 (2), 60-68.
3. INEGI (1998). Cartas topográficas, E14A23 Morelia y E14A22 Pátzcuaro, escala 1:50.000.
4. Iraola, V. (2001). Introducción a los ácaros (II): Hábitats e importancia para el hombre. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 28, 141-146.
5. Moraza, M. L. (2007). Composición, estructura y diversidad de la comunidad de ácaros Mesostigmata de un hayedo natural (Fagus sylvatica) del sur de Europa. Graellsia, 63(1), 35-42.
6. Palacios-Vargas, J. G., Mejía-Recamier, B. E., Cutz-Pool, L. Q., Lot, A., & Cano-santana, Z. (2009). Microartropodos edáficos. Biodiversidad del ecosistema del perdregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, 203-211.
7. Socarrás, A. (2013). Mesofauna edáfica: indicador biológico de la calidad del suelo. Instituto de Ecología y Sistemática. Pastos y Forrajes, Vol. 36, No. 1.

8. Socarrás, A. A., & Robaina, N. (2011). Caracterización de la Mesofauna edáfica bajo diferentes usos de la tierra en suelo Ferralítico Rojo de Mayabeque y Artemisa. *Pastos Forrajes*, 34(2), 185-197.
9. Tila M. Pérez, Guzmán-Conejo C., Montiel-Parra G., Paredes-León R. y Rivas G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Rev. Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85:S399-S407, 2014 DOI: 10.7550/rmb.36160.
10. Vargas-Sandoval, M. (2019). Ácaros (Arachnida: Acari). En: *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado 2*, vol. II. CONABIO, México, pp. 369-375.

RELACIÓN TALLA-PESO DE *MACROBRACHIUM ACANTHURUS*, UN LANGOSTINO QUE HABITA EN LA MIXTEQUILLA, VERACRUZ (MÉXICO)

Adriana Vargas Rosas, Javier Iván Lozolla Ortiz, Osvaldo Téllez Acosta*, Lucía Viridiana González López, Isis Adileni Vergara Luviano, María Teresa Núñez Cardona y Nancy Carolina Torres Corona

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Departamento El Hombre y su Ambiente, Licenciatura en Biología
*hv19vargasrosas@gmail.com

RESUMEN

Los langostinos (familia Palaemonidae, Orden Decapoda), habitan en ambientes acuáticos diversos, sus especies, principalmente las de *Macrobrachium*, ocupan la mayoría de los cuerpos de agua¹. *M. acanthurus* es de importancia comercial y alimentaria, aunque en la Mixtequilla solo se comercializa de manera local (consumo familiar). Actualmente se desconoce la morfometría de *M. acanthurus* lo que ayudaría a la explotación sustentable de este recurso. En esta investigación se realizó el análisis morfométrico de *M. acanthurus* y se determinó la relación de su talla:peso. Los ejemplares *Macrobrachium* fueron colectados (enero a junio de 2019) en el río El Camarón (La Mixtequilla, Veracruz). Se hicieron registros de su peso y morfometría (longitud del cefalotórax, quelas, talla total de la espina del rostro al telson) para finalmente calcular la relación longitud-peso de los organismos mediante la ecuación de von Bertalanffy² y con el programa FISAT³ se analizó la distribución mensual de la longitud total de los machos y hembras para determinar el crecimiento de *M. acanthurus*. Fueron capturados 297 individuos (160 machos y 137 hembras). La relación longitud-peso indicó un crecimiento isométrico para la población (la talla y el peso varían de manera proporcional a una relación 1:3). La talla total promedio de los langostinos fue de 9.39 cm (<5.0 cm, >16.2 cm) y el peso promedio fue de 8.8 g (<1.0 g, > 47.5 g). En junio se observó un mayor número de adultos de *M. acanthurus* y de enero a marzo predominaron las formas juveniles. La relación talla-peso fue mayor en machos que en hembras en mayo -junio; ambos factores van en aumento a medida que se acerca el período de lluvias lo cual es necesario para la reproducción de *M. acanthurus*.

INTRODUCCIÓN

Los langostinos (familia Palaemonidae) son los crustáceos más diversos dentro del orden Decapoda, su distribución geográfica y batimétrica son amplias; están representados por numerosas especies en los sistemas marinos, estuarinos y dulceacuícolas⁴. Los langostinos de agua dulce, del género *Macrobrachium* se encuentran en la vertiente del Golfo de México, en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche; en especial, en el estado de Veracruz, *Machrobrachium acanthurus* habita en la parte baja de las cuencas de los ríos, en aguas salobres. Estos organismos tienen un papel ecológico fundamental en la dinámica ambiental de los ecosistemas de ríos y lagunas, tanto costeros como continentales⁵.

En el ciclo de vida de las especies de *Machrobrachium* los adultos crecen en agua dulce y migran en la época de reproducción, en busca de agua salobre, donde eclosionan sus huevos y las larvas desarrollan las diferentes etapas hasta transformarse en post-larvas (que tienen la forma de adulto). Una vez que alcanza esta forma, migran hacia aguas de menor salinidad y agua dulce; durante este trayecto son consumidas por otras especies de manera natural. Las especies de *Machrobrachium* han soportado una intensa pesquería artesanal en todo el estado de Veracruz, por los volúmenes de captura, su valor económico y nutricional, su sabor y por la zona extensa de donde se pesca, propiciando una derrama económica importante⁶.

De acuerdo con las adaptaciones que presentan, especialmente en su desarrollo embrionario y larval las especies de *Machrobranchium*, son divididas en dos grupos. Uno comprende a las especies que completan su desarrollo larval (abreviado) y adulto en agua dulce; producen huevos grandes pero en pocas cantidades. El segundo grupo, al que pertenece *M acanthurus*, está formado por individuos que producen huevos de menor tamaño, pero en mayor número, pasan por una serie de etapas zoeal, antes de alcanzar la etapa juvenil y requieren de aguas estuarinas y saladas para completar su desarrollo⁷.

Los langostinos tienen un papel ecológico fundamental en la dinámica ambiental de los ecosistemas de ríos y lagunas, tanto costeros como continentales ⁴, en general, son omnívoros, carroñeros, detritívoros, también consumen algas y macroinvertebrados; sirven de alimento para peces, aves, reptiles y algunos mamíferos (Ej. mapaches y nutrias); participan en la recirculación de energía y nutrientes en el bentos, donde remueven los sustratos y lo modifican, participando activamente en los procesos biogeoquímicos de los ambientes acuáticos, así mismo, evitan la acumulación de materia orgánica y la consecuente anoxia y niveles altos de amonio ⁵.

En la zona del Golfo de México (estados de Tabasco y Veracruz), el camarón prieto *M. acanthurus* está sujeto a pesquerías artesanales de mayo a agosto, coincidiendo con la época de migración y reproducción de este organismo. En los últimos años, se han reducido los volúmenes de su captura, disminuyendo consecuentemente la fuente de ingresos económicos de los habitantes por este recurso. Lo anterior, se debe, entre otros factores a la sobrepesca a la que ha sido sujeto y la contaminación de los ríos donde habita (ej. por actividades industriales, asentamientos humanos), que aumentan la concentración de materia orgánica, afectando la calidad del agua y a las especies presentes en los cuerpos de agua⁸.

Los langostinos o camarones de río como *M. acanthurus*, son capturados, para consumo local y para su venta, por los habitantes de la Mixtequilla, considerándose como una actividad económica alternativa. En el presente estudio se realizó se determinó la relación talla-peso de las poblaciones de *M. acanthurus* con la finalidad de aportar información sobre su historia de vida, lo cual es de gran utilidad para conservar su permanencia en los sistemas acuáticos y aprovechar, de manera sustentable a este recurso natural.

TEORÍA

El cuerpo de los langostinos se divide en: cefalotórax, abdomen y telson (figura 1). Los dos primeros están conformados por 19 segmentos (13 en el cefalotórax y seis en el abdomen) y a cada uno de estos le corresponde un par de apéndices o estructuras denominadas anténulas, antena, mandíbula primera y segunda maxila; primero, segundo y tercer maxilípodo, quela, pereiópodos (patas caminadoras) y pleópodos (apéndices natatorios)⁹.



Figura. 1. Morfología general de *M. acanthurus* colectado en el río Blanco (El Camarón)

En los camarones o langostinos del género *Macrobrachium*, se presenta una diferenciación sexual, por ello, es posible distinguir al macho de la hembra, especialmente en su estadio adulto. En el "camarón prieto" *M. acanthurus*, el macho es considerablemente más grande y robusto que la hembra; existe una relación directa entre el estadio sexual de las hembras y su longitud total, esto es que, a medida que aumenta la longitud, también su madurez se incrementa¹⁰. El gonoporo (abertura sexual) de *M. acanthurus*, es globular y en el macho se encuentra en la base del quinto par de pereiópodos y en las hembras, en el tercer par de estos. Las hembras presentan una cámara

espaciosa incubadora, como la llama Ling (1969)¹⁰, formada por la prolongación de las pleuras abdominales¹⁰.

El ciclo de vida de la mayoría de las especies de *Macrobrachium* es muy similar. El apareamiento tiene lugar pocas horas después de que la hembra muda. El macho deposita esperma en la base de las patas de la hembra e inmediatamente después esta oviposita, y la fecundación de los óvulos se efectúa al contacto con el esperma¹¹. Las hembras grandes producen generalmente más óvulos que las pequeñas, los huevos se fijan en las cerdas de los pleópodos de la hembra y su incubación se efectúa en, aproximadamente, 19 días a temperaturas de 26° a 28 °C. Las hembras fertilizadas migran hacia regiones de aguas salobres donde los huevos eclosionan; esto ocurre principalmente en época de lluvias¹¹.

Se ha observado, que las hembras ovígeras de *M. acanthurus* de 70-75 mm de longitud total, pueden tener alrededor de 5,500-6,000 huevecillos en promedio, los cuales, a los 32-42 días del desove, se transforman en larvas¹⁰. Desde el momento de la eclosión, las larvas son activas nadadoras, sin embargo, inicialmente no son tan fuertes como para resistir el embate de la corriente y cualquier larva eclosionada en el río es arrastrada hacia aguas salobres. Transcurridos entre 35 y 55 días de la eclosión, las larvas atraviesan aproximadamente por 12 etapas antes de ser juveniles.

Durante el ciclo de vida de los langostinos, experimentan mudas, resultado de su desarrollo, en los juveniles, estas ocurre cada 4-6 días; pasados dos o tres meses, muchos alcanzan lugares del río donde predomina el agua dulce, para entonces los animales jóvenes ya tienen de 6 a 7 cm de largo, pesan alrededor de 6.0 g cada uno y su aspecto es como el de un adulto. Tan pronto como los langostinos cambian de larva al estado juvenil se trasladan al fondo del río y viven bajo piedras, varas y vegetación sumergida, donde encuentran una protección efectiva. La madurez sexual se alcanza en seis meses bajo condiciones favorables¹¹.

PARTE EXPERIMENTAL

La Mixtequilla es un humedal neotropical ubicado en el estado de Veracruz, forma parte del sistema lagunar de Alvarado, es un sitio Ramsar (1355); el Río Blanco atraviesa este humedal (figura 2). Su clima es cálido del tipo Aw2(i)w” con una temperatura promedio anual de 25.9 °C, en el mes más frío alcanza 22.6 °C y 28.3°C el más cálido; la lluvia promedio anual es de 1,531.8 mm. La temporada de lluvias inicia en junio y termina en octubre; generalmente la estación seca se presenta de enero a junio¹². La zona de estudio es conocida como El Camarón (La Mixtequilla), por donde fluye el río Blanco, que recibe aguas residuales de industrias como la azucarera, la producción agropecuaria (Ej. presencia de potreros y ganadería), además de diversos poblados cercanos, los cuales contribuyen a la contaminación del agua del y los suelos del lugar.



Figura 2. Ubicación de la zona de estudio (Google Maps).

Los ejemplares de *M. acanthurus* fueron colectados en los meses de enero a junio de 2019, en el río Blanco (El Camarón), para ello fueron empleadas trampas tipo clarín (rectangulares con un embudo de entrada y dimensiones de 33.5X 28 cm.). Tras la colecta, fueron separados por sexos: se hicieron registros de su peso (balanza digital Ohaus) y mediciones de la longitud del cefalotórax, quelas, talla total (de la espina del rostro al telson) utilizando, un vernier (individuos pequeños) y una regla graduada (ejemplares de talla mayor), para finalmente calcular la relación longitud-peso de los organismos mediante la ecuación de von Bertalanffy² que es: $W=aL^b$, donde: W = peso, a =punto de intersección al origen y L = talla total.

Debido a que la longitud es una magnitud lineal y el peso es igual al cubo de la talla, si un individuo mantiene su forma al crecer, entonces el crecimiento es isométrico ($b=3$). Cuando $b>3$, los individuos de mayor talla han incrementado su peso en mayor proporción que su longitud, presentando crecimiento alométrico positivo. En cambio, cuando $b<3$, los individuos incrementan preferencialmente su longitud relativa más que su peso, se consideraron especies de crecimiento isométrico si los valores de b resultaron entre 2.5-3.5. El análisis de la longitud total en machos y hembras se realizó mediante un programa³. Se analizó la distribución mensual de la longitud total de los machos y hembras para determinar el crecimiento de *M. acanthurus*.

RESULTADOS

Durante el período de estudio se capturaron 297 individuos de *Macrobrachium acanthurus* (160 machos y 137 hembras), presentándose, prácticamente, en una relación 1:1 (tabla 1), estos registros difieren con los obtenidos para esta especie en la Laguna Santa Anita y el río González, ubicados en Tabasco, en donde la relación fue de dos machos por cada hembra¹⁰, estas variaciones posiblemente se deben a la migración de las hembras hacia aguas salobres para el desove y eclosión de huevecillos.

La relación longitud-peso de la población, se presenta en la figura 3, los valores del exponente fue de $b=2.9706$ (población), lo que indica que el crecimiento de la población es isométrico, esto es que la talla y el peso varían de manera proporcional a una relación 1:3.

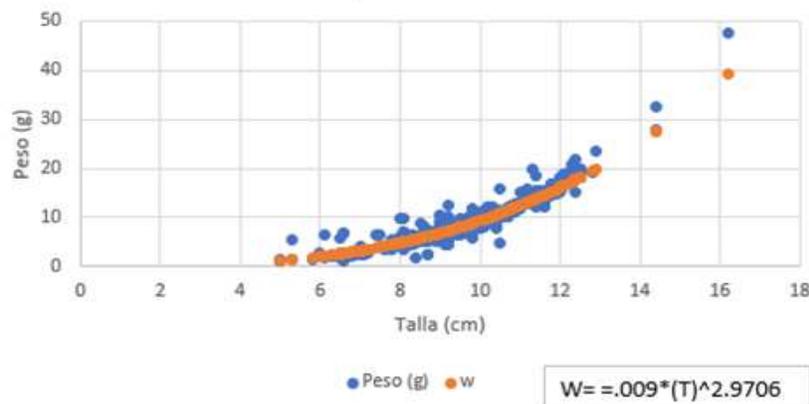


Figura 3. Relación talla-peso de la población de *Macrobrachium acanthurus*.

La talla promedio del total de los langostinos colectados fue de 9.39 cm, la menor de 5.0 cm y la máxima de 16.2 cm, en tanto que el peso promedio fue de 8.8 g, el mínimo de 1.0 g y el mayor de 47.5 g. Las diferencias de talla y peso promedio entre machos y hembras se presentan en la tabla 1 y las figuras 4 y 5.

Se ha reportado¹³ que en el Este de Brasil, *M. acanthurus* se reproduce todo el año, pero la temporada más intensa se presenta durante el verano, en donde los machos alcanzan tallas máximas de 13.8 cm y las hembras de 10.8 cm; las tallas registradas para *M. acanthurus* colectados en El Camarón fueron mayores.

Tabla 1. Talla y pesos promedio de los machos y hembras de *Macrobrachium acanthurus* y los valores de t y P, resultantes de las pruebas de comparación de ambos promedios.

Ejemplares (297)	Talla promedio(cm)	Peso promedio (g)	Modelo
Hembras (137)	9.16	8.48	$W=0.008*(T)^{3.0916}$
	$t=8.85$ $P<0.05$	$t=8.41$ $P<0.05$	
Machos (160)	9.59	9.08	$W=0.015*(T)^{2.75}$

El valor de “t” indica el promedio para las tallas y el peso promedio de los ejemplares, de esta manera es posible conocer qué tanto variaron las poblaciones entre machos y hembras; por otro lado, con el valor de P se visualiza las posibles diferencias (significativas) entre las tallas y pesos en ambos sexos.

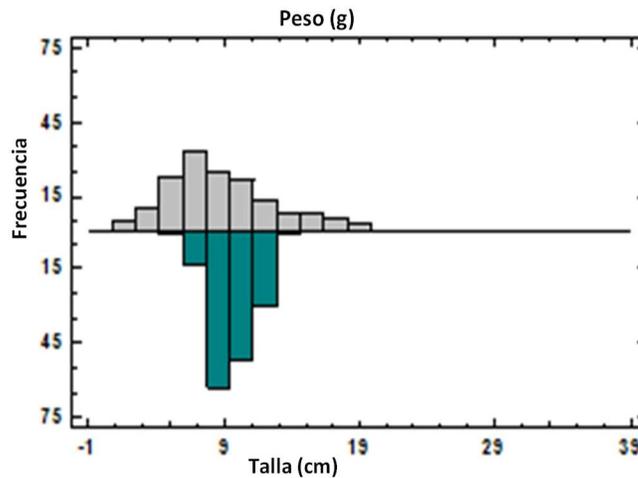


Figura 4. Distribución del Peso y talla en machos de *M. acanthurus*, colectados de enero a junio, en el río Blanco (El Camarón, la Mixtequilla, Veracruz).

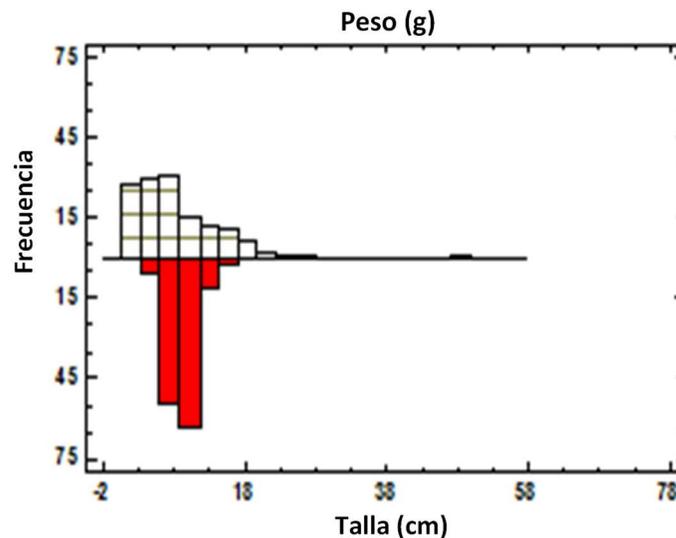


Figura 5. Distribución del Peso y talla en hembras de *M. acanthurus*, colectados de enero a junio, en el río Blanco (El Camarón, la Mixtequilla, Veracruz).

Si bien el crecimiento de los ejemplares, tanto en hembras como en machos, fue diferente, en ambos este fue isométrico, proporcional con respecto al tiempo (figura 6), esto difiere con el crecimiento reportado para especies como *M. tenellum* en donde se observó que presentan crecimiento alométrico pues crecen más en talla que en peso¹⁴.

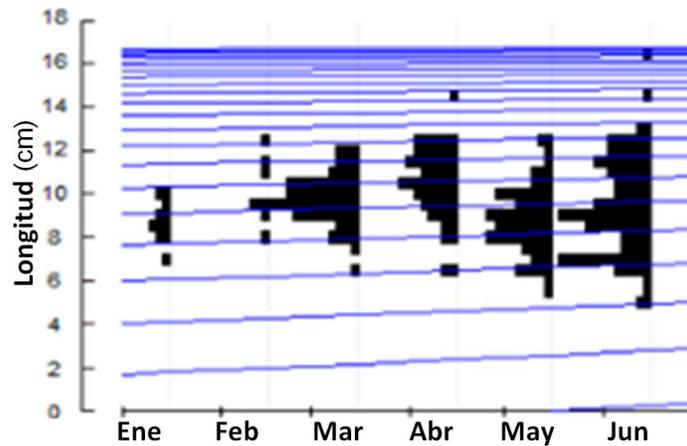


Figura 6. Distribución de las tallas (longitud) de todos los ejemplares de *M. acanthurus*, colectados durante el período de enero a junio de 2020 en el río Blanco (El Camarón, La Mixtequilla)

CONCLUSIONES

El crecimiento en los machos y hembras de *M. acanthurus* fue isométrico; en los meses de mayo-junio, la relación talla-peso fue mayor en todos los ejemplares; Los organismos se encuentran con mayor talla-peso, a medida que transcurren los meses y esta relación es mayor en junio, que corresponde al período de lluvias, lo que favorece su reproducción.

AGRADECIMIENTOS

A la Señora Yadira Reyes; los Señores Gaspar y Luis Yépez) por el valioso apoyo para la colecta de los ejemplares de *M. acanthurus* y el trabajo de campo. A la Dra. María del Carmen Monroy-Dosta por su valioso apoyo académico y las gestiones realizadas para la salida de campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. G. H. Read, "Factors affecting the distribution and abundance of *Macrobrachium petersi* (Hilgendorf) in the Keiskamma River and Estuary", South Africa. Estuar. Coast. Shelf. Sci., Vol. 21, 3, 1985, pp. 313-324.
2. R. Froese, "Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations", J. Appl. Ichthyol., Vol. 22, 4, 2006, pp. 241-253.
3. FISAT. 2002. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/topic/16072/en> (consultado el 4/02/2020).
4. P. Hernández-Sandoval, "Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia del langostino *Macrobrachium occidentale* y del acocil *Cherax quadricarinatus*" (Tesis, IPN. Sinaloa, México, 2008), pp. 60
5. M. U. García-Guerrero, F. Becerril-Morales, F. Vega-Villasante, L. D. Espinosa-Chaurand "Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación" Lat. Am. J. Aquat. Res., Vol. 41, 4, 2013, pp. 651-675.
6. R. M. Lorán-Nuñez, "Observaciones de la pesquería de langostino (*Macrobrachium* sp.) en el estado de Veracruz, México", Ciencia Pesquera, Vol., 25, 2, 2017, pp.31-34.

7. L. L. Rólier, I. S. Wehrtmann, "Reproductive biology of the freshwater shrimp *Macrobrachium carcinus* (L.) (Decapoda: Palaemonidae) from Costa Rica, Central America". *J. Crustacean Biol.*, Vol. 29, 3, 2009, pp. 343-349.
8. A. Villafuerte-Mojica A., L.H.H. Hernández, M.A. Fernández-Araiza, O. Á. López. "Contribución al conocimiento de los requerimientos nutricionales del langostino nativo (*Macrobrachium acanthurus*)", *Hidrobiológica*, Vol. 26, 1, 2016. pp. 15-22.
9. W.E. Liñan-Giraldo, en "Crianza de camarones" (Macro Colección de Acuicultura. Lima, Perú, 2008), 96 pp.
10. B, A. A. Granados, "Aspectos reproductivos del camarón prieto *Macrobrachium acanthurus* Wiegman, 1836 en la cuenca del Río González, Tabasco, Mexico Crustacea Decapoda Palaemonidae", *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. UNAM*, Vol. 111, 1984, pp. 1-22.
11. F. Díaz-Monge, M. Díaz, R. Rodríguez, en "Producción larval de camarón de río nativo, *Macrobrachium americanum* en laboratorio (Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Guatemala, 2001), pp. 88.
12. J. A. Viccon-Pale, P. Ortega, L. Mendoza-Vargas, P. Castilla-Hernández P, A. López-Cuevas, A. Meléndez-Herrada, F. Rivera-Becerril, G. Vela-Correa, M. Signoret-Poillon. 2016. "Structure and population dynamics of the secondary burrower crayfish *Procambarus acanthophorus* from a tropical Mexican wetland", *Can. J. Zool.* 94, 2016, pp. 479-488.
13. G. Bertini, J. A. Baeza, E. Perez, E., "A test of large-scale reproductive migration in females of the amphidromous shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) from south-eastern Brazil", *Mar. Freshwater Res.*, Vol. 65, 1, 2014, 81-93.
14. E. E. Jáuregui-Velázquez, S. Q. Bárcenas-Gutiérrez, "Estructura de tallas de *Macrobrachium tenellum* (Decapoda: Palaemonidae) en el estero el Salado, Puerto Vallarta, Jalisco, México", *Biocyt: Biología, Ciencia y Tecnología*, Vol. 10, 2017, pp. 37-39.

EFFECTO DE INFUSIONES DE MANZANILLA, HIERBABUENA Y CITRONELA EN EL ORGANISMO MODELO CAENORHABDITIS ELEGANS EXPUESTO A PERÓXIDO DE HIDROGENO

Diego Wenceslao Aguilar Ocampo¹, Antonio Ruiz Martínez¹, Araceli Castillo-Romero², Rafael Cortés-Zárate², Susan Andrea Gutierrez-Rubio³, Abel Hernández-Chávez³, Gabriela Camargo-Hernández⁴ y Leonardo Hernandez-Hernandez³

¹CUCEI-Universidad de Guadalajara, ²Departamento de Microbiología y Patología. CUCS-Universidad de Guadalajara, ³Departamento de Fisiología. CUCS-Universidad de Guadalajara, ⁴Departamento de Ciencias de la Salud. CUALTOS-Universidad de Guadalajara.

leohhdez@hotmail.com

RESUMEN

Una infusión es una bebida obtenida a partir de ciertos frutos o hierbas aromáticas, que se introducen en agua muy caliente, pero sin que esta llegue a hervir. Además, no contiene ningún tipo de sustancia estimulantes como la cafeína o la teína. Estudios de estos productos orientados supuestamente a mantener la salud, usando un organismo animal para modelar enfermedades humanas definidas sobre una base molecular, contribuiría a validar su uso como coadyuvante en la prevención o tratamiento de enfermedades y mejorar nuestra calidad de vida. La simplicidad y el costo-beneficio del cultivo del nematodo *C. elegans* lo hacen un efectivo modelo in vivo para este tipo de estudio sobre todo considerando un efecto antioxidante. El propósito de este estudio fue evaluar de forma preliminar el efecto protector de 3 infusiones (Manzanilla MZ, Citronela CN y Hierbabuena HB) sobre gusanos expuestos al peróxido de hidrogeno. En este estudio se utilizaron nemátodos de la cepa N2 (Wild Type) de edad sincronizada cultivados en placas de agar-NGM a 19°C. Establecimos un grupo no tratado (CTL), un grupo tratado con infusión (MZ, CN o HB), un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno y tratado con infusión (H₂O₂ + MZ, CN o HB). Para los ensayos de supervivencia los gusanos fueron sujetos a tratamiento con H₂O₂ (10µM). Se contaron los gusanos vivos y muertos cada hora por 5 horas. Se determino si el sujeto estaba vivo o muerto mediante la respuesta al toque al cuerpo usando un alambre de platino estéril. Con los datos resultantes se elaboraron curvas de Kaplan-Meier y se analizaron usando la prueba Log-Rank considerando como diferencia significativa entre curvas, una P<0.05. Las curvas de sobrevivencia de todas infusiones probadas junto a la exposición a H₂O₂ mostraron ser significativamente diferentes a la curva del grupo expuesto solo a peróxido de hidrogeno, siendo la MZ lo que más incremento la sobrevivencia media. Los resultados obtenidos sugieren que las infusiones probadas incrementaron significativamente la supervivencia media de los nematodos expuesto a H₂O₂, destacándose en este sentido la infusión de Manzanilla.

INTRODUCCIÓN

Las infusiones de hierbas son bebidas que se preparan a partir de las partes aéreas (hojas secas, flores y frutos) de varias hierbas o plantas aromáticas a las cuales se les vierte agua a punto de hervir y se les permite reposar durante un tiempo (1). Se considera que las infusiones tienen propiedades nutraceuticas, en el sentido de que es un alimento que, además de su valor nutricional básico, proporciona beneficios para la salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades (2) En este sentido, los tés de hierbas se usan como vehículos terapéuticos en muchas formas de medicina tradicional y son una bebida mundial popular (3).

El consumo de este tipo de bebidas, sobre todo de las infusiones preparadas con manzanilla, hierba limón, hierbabuena, árnica y boldo, es común entre la población mexicana, pues además de sus sabores agradables, se les atribuyen efectos benéficos a la salud, entre los que se encuentran la actividad antimicrobiana, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria aguda.

TEORÍA

En los sistemas biológicos, incluido el cuerpo humano, se mantienen un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de prooxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensas antioxidantes (4). Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran 3 enzimas que son fundamentales; la catalasa (CAT), el superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas detoxifican los compuestos reactivos Superóxido y H_2O_2 . La pérdida del balance mencionado arriba lleva a un estado de estrés oxidativo, que se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres, en especial de las ERO, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante. Durante este proceso se producen reacciones químicas sobre los lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN en el interior de las células, lo que puede desencadenar daños irreversibles y muerte.

Como ya se mencionó en la introducción se le ha atribuido capacidad antioxidante, básicamente relacionado a su contenido de compuestos fenólicos. El contenido de polifenoles se considera un indicador de calidad del té y, no obstante, puede variar dependiendo de las regiones donde estas hierbas se han cultivado en diversas regiones. Actualmente hay una gran número de marcas comerciales disponibles en el mercado, las cuales prometen diversos beneficios en la salud que probablemente no son necesariamente precisos.

Estudios de estos productos orientados supuestamente a mantener la salud, usando un organismo animal para modelar enfermedades humanas definidas sobre una base molecular, contribuye a validar su uso como coadyuvante en la prevención o tratamiento de enfermedades y mejorar nuestra calidad de vida. Efectivamente, en varios modelos animales se han realizado investigaciones sobre la capacidad antioxidante de algunos compuestos de origen vegetal. Algunas de estas investigaciones se han llevado a cabo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El *C. elegans* es un organismo simple, el hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas y el macho adulto tiene 1031. Tanto el número de células como su posición son constantes. Con la ayuda de un microscopio, los animales, pueden ser observados y manipulados de forma individual. Otra ventaja que ofrece el modelo es su fácil mantenimiento en el laboratorio y bajo costo (5). Además, se ha demostrado que las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPx) se encuentran en el *C. elegans* y forman parte de su sistema de defensa antioxidante, del mismo modo que ocurre en mamíferos. La vía de señalización de la insulina IGF-1, que se ha relacionado con la respuesta al estrés, se encuentra en el *C. elegans* y también se encuentra ampliamente conservado en mamíferos. Adicionalmente, investigaciones previas han reportado que la administración de H_2O_2 de forma exógena, es capaz de producir estrés oxidativo en el *C. elegans* (6), lo cual se hace evidente tras la reducción de la supervivencia en éste. Por lo anterior, el gusano *C. elegans* nos parece un magnífico modelo para observar estrés oxidativo, pues los efectos observados por su exposición a ERO, y se podrían extrapolar a los seres humanos, por lo menos a un nivel celular y molecular. En este mismo orden de ideas nos parece que podría ser útil en el estudio de productos nutraceuticos.

El propósito de este estudio fue evaluar de forma preliminar el efecto protector de 3 infusiones preparadas a partir de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), citronela o Zacate Limon (*Cymbopogon citratus*) y Hierbabuena (*Mentha viridis*) sobre gusanos expuestos al peróxido de hidrogeno.

PARTE EXPERIMENTAL

Cepas de *C. elegans*

En este trabajo se emplearon gusanos *C. elegans* de la cepa N2 (Wild Type) del tipo Bristol compradas en el *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, EUA). Todos los experimentos se realizarán sobre animales sincronizados adultos de acuerdo a métodos estándar (7). Los stocks de las cepas de gusanos fértiles fueron cultivados, de acuerdo con técnicas estándar, en placas de Petri con Agar-NGM mantenidas a un rango de temperaturas entre 16 y 19°C con bacteria *Escherichia Coli* de la cepa OP50 como fuente de alimento (7).

Preparación de las infusiones

Se adquirió varios paquetes de Te herbal surtido clásico de la marca McCormick (Herdez SA de CV, Mexico, DF), que incluye 20 bolsitas filtrantes de diferentes hierbas deshidratadas para su presentación en infusión. Para este estudio se probaron Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), la citronela o Zacate Limon (*Cymbopogon citratus*) y Hierbabuena (*Mentha viridis*). Se prepararon las infusiones siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente, se coloca en un vaso de precipitados con 200 mL de agua potable caliente (80°C) sin hervir, un par de bolsita filtrante (3 g) con la hierba en estudio. Se cubrió y dejó reposar 10 minutos. Los experimentos se realizan con las infusiones a temperatura ambiente.

Grupos de Estudio

Para estudiar el efecto de las infusiones herbales estudiadas se establecieron un grupo control (CTL) que no recibió ningún tratamiento y 4 grupos de estudio: un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno 0.5 mM (H2O2), un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno 0.5 mM y tratado con infusión de Manzanilla (H2O2+MZ), un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno 0.5 mM y tratado con infusión de Hierbabuena (H2O2+HB), un grupo expuesto a peróxido de hidrogeno 0.5 mM y tratado con infusión de Citronela (H2O2+CN). En todas las infusiones la concentración final de exposición fue de 7.5 mg/mL.

Ensayos de supervivencia

C. elegans de la cepa N2 Bristol (WT) se transfirieron a placas de 96 multipocillos de fondo redondo y fueron expuestos a los diferentes tratamientos mencionados en los grupos de estudio. De ahí se contaron el número de gusanos muertos y vivos, cada hora por cinco horas, Se registraron a los gusanos como vivos si mostraron movimiento voluntario y muerto si no lo hicieron. Con estos datos se elaboraron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Se realizaron los experimentos por triplicado.

Análisis Estadístico.

Todos los gráficos y los análisis estadísticos fueron hechos con el software SigmaPlot 11.0. Los estudios de supervivencia se analizaron mediante la prueba de supervivencias de Kaplan-Meier y fueron ponderadas con pruebas de log-Rank, la diferencia entre curvas se estimó con la prueba post-hoc de Holm-Sidak. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Puesto que este estudio se pretendía utilizar las infusiones a las concentraciones del consumo humano. Consecuentemente, la concentración final de exposición de los gusanos fue la correspondiente a una infusión preparada con 1.5 g de hierba deshidratada y 200 mL de agua (aproximadamente 7.5 mg/mL). Ninguna de las infusiones por sí solas indujeron la muerte de ninguno de los individuos expuestos por hasta 5 horas, al igual que los gusanos que se encontraban solo en agua potable (Control, CTR). Estos datos se omitieron en virtud de solaparse con el CTR, pero sin duda demuestran que no presentan ningún efecto sobre la viabilidad del nematodo.

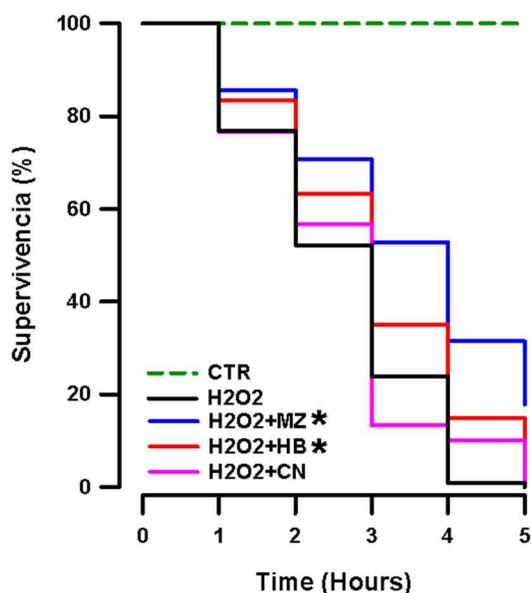


Figura 1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el efecto de Manzanilla (MZ), Hierbabuena (HB) y Citronela (CN) sobre la supervivencia a 0.5 mM de peróxido de Hidrogeno (H₂O₂). *P < 0.01 vs H₂O₂

Para confirmar si esta concentración de consumo humano brinda algún grado de protección antioxidante, realizamos curvas de supervivencia en gusanos expuestos a peróxido de hidrogeno a una concentración (0.5 mM) que hemos observado induce una tasa de supervivencia de casi 0% después de 5 horas de exposición. Así, encontramos que la infusión de citronela (CN) presento un tiempo de supervivencia media (2.6 ± 0.2 h) muy similar al que mostraron los gusanos expuestos a peróxido de hidrogeno (H₂O₂, 2.5 ± 0.1 h), y no estadísticamente diferente (LogRank $p = 0.888$, $n = 140$). Por otro lado, si observamos incrementos significativos en el tiempo medio de supervivencia en los grupos tratados con la infusión de Hierbabuena (HB, 2.967 ± 0.168 h, LogRank $p = 0.002$, $n = 140$) y con la infusión de Manzanilla (MZ, 3.4 ± 0.1 h, LogRank $p < 0.0001$, $n = 140$), siendo esta última, la que manifestó la mayor protección antioxidante (Figura 1). No obstante, ninguna neutralizo totalmente el daño oxidativo del peróxido, aunque cabe aclarar que este insulto oxidativo es bastante severo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que las concentraciones de consumo humano no provocan mortalidad en gusanos adultos *C. elegans* durante 5 horas continuas de exposición.

Asimismo, estas mismas concentraciones de consumo humano de las infusiones de Hierbabuena y Manzanilla confieren protección antioxidante ante el insulto oxidativo que representa la exposición al peróxido de hidrogeno 0.5 mM, a diferencia de la infusión de citronela que no muestra ninguna protección.

Esto parece coincidir al menos en parte con la experiencia anecdótica que le profieren propiedades antioxidantes a estos productos herbolarios. Finalmente, hemos mostrado la utilidad del organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, como un medio rápido y asequible para el estudio de productos nutraceuticos, tanto nuevos como los presentes actualmente en el mercado.

BIBLIOGRAFÍA

1. E. E. Muñoz-Velázquez *et al.*, Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* **3**, 481-495 (2012).
2. B. Gastaldi *et al.*, Nutraceutical Properties of Herbal Infusions from Six Native Plants of Argentine Patagonia. *Plant Foods for Human Nutrition* **73**, 180-188 (2018).
3. F. S. Poswal *et al.*, Herbal Teas and their Health Benefits: A Scoping Review. *Plant Foods for Human Nutrition* **74**, 266-276 (2019).
4. J. R. Venereo Gutiérrez, Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* **31**, 126-133 (2002).
5. I. A. Hope, *C. Elegans: A Practical Approach*. O. U. Press, Ed., Series Editor (USA, New York, ed. 1, 2000), pp. 281.
6. S. S. Lee *et al.*, A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* **33**, 40-48 (2003).
7. I. A. Hope, *C. elegans: A Practical Approach*. I. A. Hope, Ed., Practical Approach Series (Oxford University Press, Oxford ; New York, ed. 1 edition, 1999), vol. 213.

IDENTIFICACIÓN DE UNA FAMILIA DE PROTEÍNAS ESPECIALIZADAS EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO DE *HELICOBACTER PYLORI* A PARTIR DE FUENTES HUMANAS.

Marco Antonio González-López^{1*}, Cristhían Sánchez-Cruz², José de Jesús Olivares-Trejo².

¹Cátedra-CONACYT. Unidad de Oncología Torácica. Instituto Nacional de Cancerología

²Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

*marconyqfb@yahoo.com.mx

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa, la cual ha sido asociada a úlceras, gastritis, duodenitis, es considerada como el principal agente causal de cáncer gástrico. Se sabe que la infección por *H. pylori* es la enfermedad bacteriana crónica más extendida del mundo. Esta bacteria coloniza la mucosa gástrica que cubre el epitelio, durante este proceso secreta proteínas que le permiten sobrevivir y adquirir hierro. Debido a que este proceso aún no está completamente descrito, se realizó un análisis *in silico* del genoma de *H. pylori*, se encontró que posee una familia de tres proteínas de membrana externa (FrpB) las cuales son reguladas por hierro. Dos de ellas (FrpB1 y FrpB2) fueron purificadas y estudiadas como proteínas recombinantes, se demostró su capacidad de unir hierro a partir de hemo y hemoglobina. FrpB3 es una proteína perteneciente a esta familia que aún se desconoce su mecanismo de adquisición de hierro. Material y métodos: Se obtuvieron proteínas de membrana de *H. pylori*, fueron purificadas por cromatografía de afinidad e identificadas por espectrometría de masas, una proteína fue identificada como FrpB3. Se analizó la expresión de gel *frpB3* por PCR en tiempo real, demostrándose que su expresión es regulada y dependiente de la fuente de hierro disponible. FrpB1 y FrpB2 se utilizaron como controles. Resultados: *frpB3*, se sobre expresa en un medio con hemoglobina como única fuente de hierro. *frpB1* fue sobre expresada en condiciones de hemo, de la misma manera *frpB2* fue inducido en la presencia de hemo y hemoglobina. Conclusiones: *H. pylori* expresa, dependiendo de la fuente de hierro disponible, de manera diferencial los genes *frpB1*, *frpB2* y *frpB3*, esto puede ser un indicativo de la adaptabilidad de *H. pylori* a medios extremos donde las fuentes de hierro son escasas. Este trabajo en general demuestra la importancia de la adquisición de hierro de *H. pylori* para su crecimiento y sobrevivencia.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas que infectan al ser humano necesitan hierro para llevar a cabo su metabolismo y procesos infecciosos¹. Sin embargo, el hierro libre resulta insuficiente para que las bacterias puedan sobrevivir², ante esta situación las bacterias han desarrollado mecanismos para la adquisición de hierro a partir de las metaloproteínas humanas como la hemoglobina, hemina, lactoferrina, transferrina y ferritina, un mecanismo eficiente es mediante la expresión proteínas de membrana³.

TEORIA

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa que coloniza el epitelio gástrico, su presencia se relaciona con padecimientos como la gastritis, úlceras y cáncer⁴, como todo patógeno requiere de hierro para su metabolismo y sobrevivencia⁵, se ha documentado que *Helicobacter pylori* obtiene hierro a partir de metaloproteínas humanas como la lactoferrina, transferrina y hemoglobina e incluso del grupo hemo⁶.

Se ha documentado que *Helicobacter pylori* sintetiza tres proteínas de membrana de 48, 50 y 77 kDa con la capacidad de unir el grupo hemo, sin embargo se desconoce su identidad⁷. Adicionalmente se han identificado otras dos proteínas de membrana, FrpB1 de 88.5 kDa, que une Hb y grupo hemo⁸ y FrpB2 de 90.8 kDa, que sólo une Hb, estas proteínas poseen los motivos FRAP y NPFL que le permiten la unión con la Hb y el grupo hemo⁹.

Se puede apreciar que Hp posee una gran batería de proteínas que le permiten la asimilación de hierro a partir varias metaloproteínas, se tiene evidencia por análisis *in silico* y homología que Hp codifica para otras proteínas con esta capacidad (putative iron regulated outer membrane protein)¹⁰. Contar con varias proteínas para la asimilación de hierro a partir de metaloproteínas no es una característica única de Hp, por ejemplo, se ha observado que la bacteria *Porphyromonas gingivalis*

también posee varias proteínas de membrana para la adquisición de hierro¹¹, por lo tanto es de esperar que una bacteria como *Helicobacter pylori* que habita un ambiente donde la disponibilidad de hierro es limitada¹² posea una gran cantidad de proteínas para tal fin, esto soportado por la información *in silico* y los hallazgos realizados por nuestro grupo de investigación. Además, se ha observado que la presencia de Hp puede provocar anemia en su hospedero¹³ lo que indica su enorme capacidad de adquirir hierro, ante esta situación creemos que Hp posee más proteínas de membrana que le permiten obtener hierro de su hospedero por lo que, hemos diseñado una metodología que nos permita localizar e identificar proteínas a nivel de membrana con esta capacidad.

PARTE EXPERIMENTAL

Condiciones de crecimiento de *Helicobacter pylori*.

La cepa *H. pylori* J99 (ATCC 700824) fue rutinariamente crecida en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5%, 37°C y en condiciones microaerofílicas (10% CO₂) por 24 horas.

Curva de crecimiento.

Las bacterias que crecieron en medio casman fueron recolectadas y lavadas tres veces con amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, posteriormente fueron pasadas a 10 mL de medio Brucella a una densidad óptica de 0.250, se dejaron en agitación a 200 rpm, 37°C y en condiciones microaerofílicas (10% CO₂) por 24 horas. Durante este periodo se monitoreo la densidad óptica (DO) cada 2h. Se tomaron las bacterias en fase exponencial, fueron lavadas con buffer Tris HCl 20mM tres veces y resuspendidas en medio Brucella con 2, 2´dipyridyl 250 mM por 12h, posteriormente la suspensión de bacterias se dividió en tres partes con una DO de 0.150. 1) bacterias sin hierro (-Fe), 2) bacterias sin hierro que fueron suplementadas a las 3h de iniciada la curva con Hb 10mM (-Fe +Hb) y 3) bacterias sin hierro que fueron suplementadas a las 3h de iniciada la curva con cloruro férrico 10mM (+Fe), se determinó la DO cada 2h.

Obtención de RNA.

Helicobacter pylori J99 fue crecida en placas de medio Casman suplementas con sangre de carnero desfibrinada al 5% durante 48 h en condiciones microaerofílicas 10% CO₂ y 37° C. Posteriormente el cultivo fue colectado y lavado 3 veces con buffer Tris HCl 20mM, las bacteria fueron resuspendidas en buffer Tris HCl 20 mM, la muestra se dividió en 4 partes: 1) Condición basal (B), fue sembrada en agar casman suplementado con sangre de carnero al 5%, 2) Condición quelante (Q), fue sembrada en agar casman con quelante (2, 2´dipyridyl) 250 µM, 3) Condición Hb, fue sembrada en agar casman con quelante (2, 2´dipyridyl) 250 µM y suplementado con Hb 20mM, 4) Condición Hm, fue sembrada en agar casman con quelante (2, 2´dipyridyl) 250 µM y suplementado con hemina 20mM. Las bacterias fueron incubadas por 14h a 37°C y 10% de CO₂.

Los cultivos fueron colectados y lavados 3 veces con Tris HCl 20mM, posteriormente se realizó la extracción de RNA mediante Trizol. Se realizó una q-RT-PCR, utilizando los primers de la tabla 1. Las condiciones de la q-RT-PCR fueron las siguientes: 50°C por 2 min, 95°C por 15 min, 40 ciclos (94°C por 15 s, 52°C por 30 s y 72°C por 30 s). Como control de carga se emplearon los primers para amplificar la sub-región del gen 16S (tabla 1), el control negativo se preparó sin la transcriptasa reversa. La cuantificación de los niveles de expresión mRNA de todos los genes, se realizó con el método delta delta Ct (2^{-ΔΔCt}).

Obtención de proteínas de membrana.

H. pylori creció en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5% por 24 ha 37°C y 10% de CO₂, posteriormente las bacterias se resembraron nuevamente en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5%, por 12 h al cabo de este tiempo las bacterias se colectaron y resuspendieron en amortiguador de lavado Tris HCl 20mM, se lavaron por centrifugación a 6000 g/ 3 min 3 veces, posteriormente la pastilla formada se resuspendió en Tris HCl 20mM, 1% Sarkosil y PMSF 1mM, las bacterias se sonicaron con pulsos de 30 s y amplitud del 60% en un baño de hielo, posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 g/20 min con la finalidad

de separar las bacterias no lisadas y cuerpos de inclusión, a partir del sobrenadante se obtuvieron las proteínas de membrana mediante ultracentrifugación 105000 g/ 1 h/ 4°C, al término se obtuvo una pastilla que se consideró contenía las proteínas de membrana, la pastilla se resuspendió en amortiguador Tris HCl 20 mM.

Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (resina-hemina).

Las proteínas de membrana se pusieron a interactuar con la cromatografía (resina) de afinidad (Sigma), cuyo ligando es el grupo hemo. Las proteínas se pusieron a interactuar con la cromatografía O. N/ 4°C y en agitación, al cabo de este tiempo las muestras se centrifugaron a 1000 g/ 1 min, se obtuvo un sobrenadante, que contiene las proteínas que no tienen afinidad por el grupo hemo (Fracción no unida), la resina se lavó 5 veces con amortiguador de lavado pH 7.0 esto eliminó uniones inespecíficas, finalmente las proteínas que se unieron al grupo hemo se eluyeron con clorhidrato de guanidina 6M.

Espectrometría de masas LC-MS/MS.

Este procedimiento se realizó para conocer la identidad de las proteínas seleccionadas, a partir de un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie se escindió la banda con un escalpelo, se lavó con agua destilada y se secó, la banda fue digerida con la enzima tripsina, posteriormente la muestra se carga al equipo Micromass QToF I, 5 ml de la muestra digerida se inyectó en una columna PepMap C18 (0.75 µm x 15 cm) y se eluyó con acetonitrilo a un gradiente lineal de 200nl/ min, el péptido eluido fue introducido al espectrómetro de masas a través de un New Objective PicoTip que a su vez estuvo sostenido por un New Objective adapter. Las condiciones del experimento son: voltaje capilar 1.8kV, voltaje del cono de tensión 32V, energía de colisión fija de 14eV a 50eV de acuerdo con la masa y la carga del ion. Los datos obtenidos fueron buscados en la base de datos www.matrixscience.com usando el algoritmo Mascot (Protein core facility Columbia University Medical Center, <http://www.cumc.columbia.edu/dept/protein/>).

Obtención y alineamiento de secuencias FrpB de *Helicobacter pylori*.

La secuencia de aminoácidos de proteínas FrpB1 (Q9ZKX4), FrpB2 (Q9ZKT4) y FrpB3 (Q9ZJA8) de *Helicobacter pylori* se lanzaron en el servidor ClustalW <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> con la finalidad de obtener el alineamiento y se empleó el programa JalWiev 10.2 para resaltar los motivos FRAP y NPNL, se empleó la secuencia ChuA (Q7DB97) de *E. coli* como molde.

Modelaje en el espacio de proteínas.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas FrpB1, 2 y 3 de Hp y ChuA de *E. coli* se cargaron en el servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>, se obtuvo el archivo PDB el cual fue visualizado en el programa Chimera 1.12.

RESULTADOS

H. pylori es una bacteria que puede mantener su metabolismo y crecimiento celular empleando diferentes fuentes de hierro. Se realizó una curva de crecimiento bajo condiciones normales de hierro, sin hierro y sin hierro más un suplemento de Hb. Se observó que esta bacteria puede mantener su crecimiento si utiliza a la Hb como única fuente de hierro (figura 1).

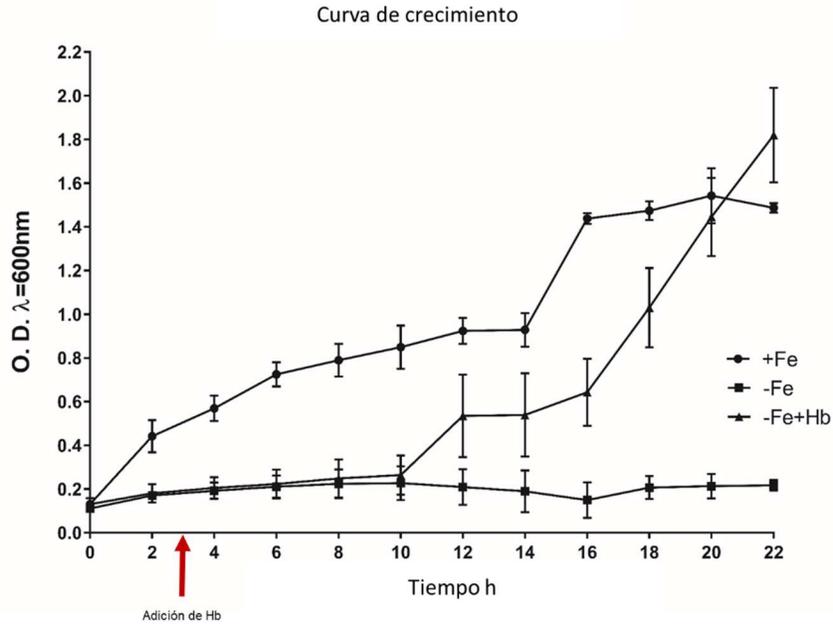


Figura 1. Curva de crecimiento. *H. pylori* creció en ausencia de hierro y no presentó crecimiento, en cambio cuando se encontraba en un medio con hierro o suplementado con Hb como única fuente de hierro, la bacteria presentó crecimiento celular.

Posteriormente las células, bajo las diferentes condiciones de crecimiento, fueron recolectadas, se obtuvieron las proteínas las cuales fueron pasadas por la columna de afinidad, las proteínas obtenidas en cada segmento fueron resueltas por electroforesis. Al momento de la elución de las proteínas afines al grupo hemo se pudo observar una banda de aproximadamente 97.4 kDa (figura 2).

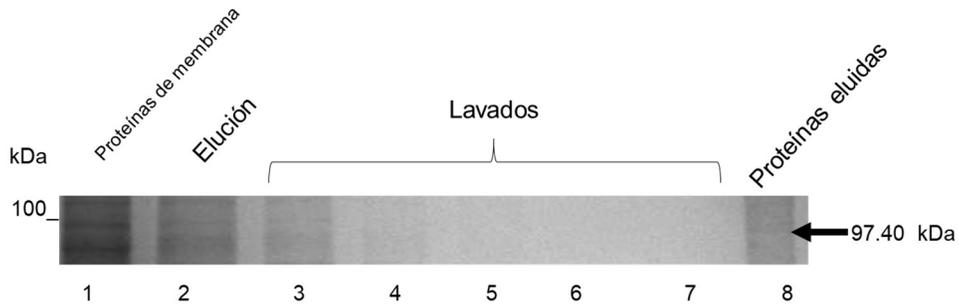


Figura 2. Electroforesis de las proteínas de *H. pylori*. Carril 1, proteínas totales. Carril 2, proteínas eluidas, estas son proteínas no afines al grupo hemo. Carriles 3-7 lavados, en estos carriles se removieron aquellas proteínas no afines al hemo. Carril 8, se puede observar la proteína afín al grupo hemo la cual tiene un peso de 97.4 kDa.

La proteína que se obtuvo por la columna de afinidad fue escindida del gel y se mandó a secuenciar por LC-MS/MS. El resultado fue analizado por el algoritmo mascot, el ensayo mostró que la proteína obtenida es la FrpB3 (Iron-regulated outer membrane protein).

Con la información obtenida, nuestro grupo de información ha identificado las tres proteínas que conforman la familia FrpB, las cuales, según la información *in silico*, son reguladas por hierro, ante esta información nuestro siguiente objetivo fue determinar si dichas proteínas son reguladas por la

presencia de diferentes fuentes de hierro y si la ausencia de una fuente de hierro puede regular su expresión a nivel de RNAm. Observamos que los niveles del gen *frpb1* se incrementó cuando la Hb es la única fuente de hierro, *frpb2* aumenta sus niveles al haber hemo como única fuente de hierro y los niveles de *frpb3* también aumentaron bajo esta condición (figura 3).

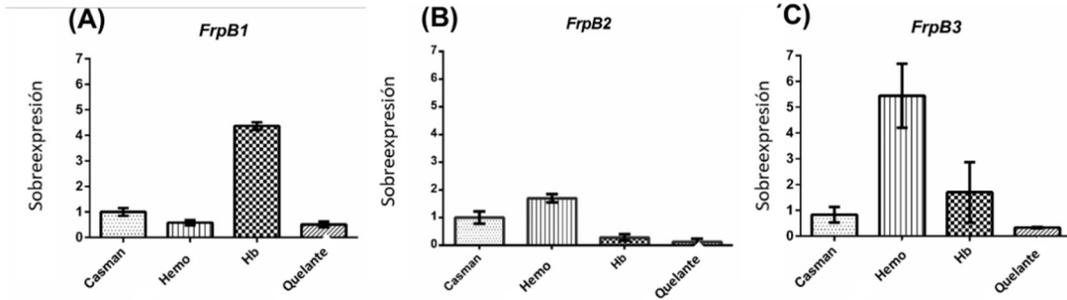


Figura 3. Sobreexpresión de los genes *frpbs* de *H. pylori* bajo diferentes condiciones de hierro. A) *frpb1*, B) *frpb2*, C) *frpb3*.

Finalmente se analizó la conformación en el espacio de las tres proteínas Frpbs, esto con la finalidad sí poseen una estructura similar a otras proteínas que, hasta el momento, se han identificado como aquellas que tienen la capacidad de unirse a diferentes fuentes de hierro como la Hb y el grupo hemo. Para nuestro análisis utilizamos como referencia la proteína ChuA de *E. coli*, la cual está plenamente identificada como una proteína que une Hb. Hemos observado que las proteínas Frpbs pertenecientes a *H. pylori* poseen una estructura propia de aquellas proteínas especializadas en la unión de Hb y hemos, además hemos comprobado que las proteínas Frpbs poseen los motivos necesarios para la unión de la Hb y el hemo (figura 4).

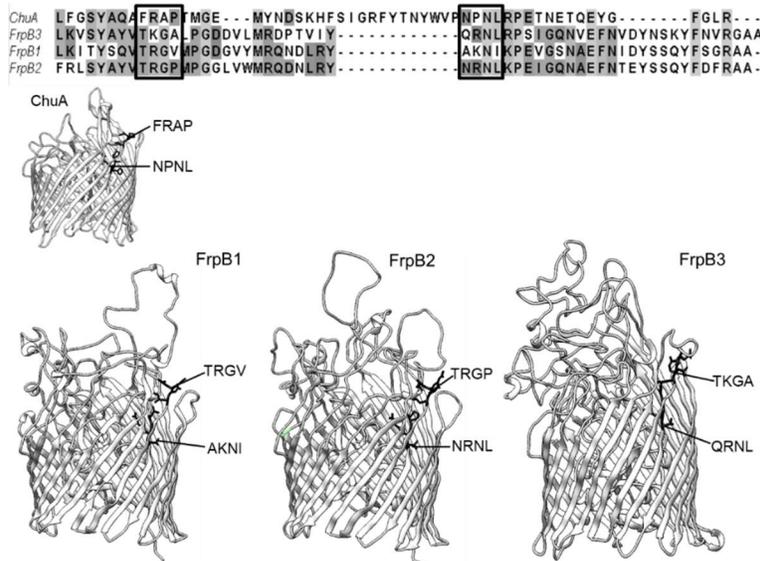


Figura 4. Estructuras tridimensionales de las proteínas Frpbs de *H. pylori*. Las proteínas especializadas en la unión de Hb y hemo tienen una forma de barril beta y presentan los motivos de unión a dicha fuente de hierro en la parte externa las proteínas. El recuadro muestra los motivos conservados necesarios para la unión de Hb y el grupo hemo.

CONCLUSIONES

Hemos demostrado que la bacteria *H. pylori* cuenta con proteínas especializadas en la adquisición de hierro a partir de fuetes como la Hb y el grupo hemo. La expresión de estas proteínas está regulada por las condiciones en las cuales crece esta bacteria, ya sea en ausencia de hierro o frente a fuentes que pueden localizarse en el ser humano. El poseer varias proteínas y que estas se regulen de manera diferencial nos muestran que *H. pylori* está adaptada a sobrevivir a diferentes fuentes de hierro dependiendo del sitio y disponibilidad del mismo, lo cual también nos habla de su capacidad de adaptación a un medio ambiente hostil como lo es el estómago.

BIBLIOGRAFÍA

1. Horton, R.H.; Moran, L.A.; Ochs, R.S.; Rawn, J.D.; Scrimgeour, K.G.. Principles of biochemistry, 3ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 2002; pp 675. ISBN. 9789702610250.
2. Liu, X.; Olczak, T.; Guo, H.C.; Dixon, D.W.; Genco, C.A. Identification of amino acid residues involved in heme binding and hemoprotein utilization in the *Porphyromonas gingivalis* heme receptor HmuR. *Infect Immun.* 2006, 74, 1222-32. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1222-1232.2006>
3. Andrews, S.C.; Robinsón, A.K.; Rodríguez-Quiñónez, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews.* 2003, 27, 215-237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
4. Wandersman, C.; Delepelaire, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004, 58, 611-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>
5. Wandersman, C.; Stojiljkovic, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 2000, 3, 215-20. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00078-3)
6. Genco, C.A.; Dixon, D.W. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol.* 2001, 39, 1-11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02231.x>
7. Perkins-Balding, D.; Ratliff-Griffin, M.; Stojiljkovic, I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004, 68, 154-71. <https://dx.doi.org/10.1128%2FMMBR.68.1.154-171.2004>
8. Kao, C.Y.; Sheu, B.S.; Wu, J.J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 2016, 39, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>
9. Kusters, J.G.; Van Vliet, A.H.; Kuipers, E.J.. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006, 19, 449-90. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
10. Senkovich, O.; Ceaser, S.; McGee, D.J.; Testerman, T.L. Unique Host Iron Utilization Mechanisms of *Helicobacter pylori* Revealed with Iron-Deficient Chemically Defined Media. *Infect Immun.* 2010, 78, 1841-1849. <https://dx.doi.org/10.1128%2FIAI.01258-09>
11. Velayudhan, J.; Hughes, N.J.; McColm, A.A., Bagshaw, J.; Clayton, C.L., Andrews, S.C.; Kelly D.J. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol.* 2000, 37, 274-86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01987.x>
12. Alm, R.A.; Bina, J.; Andrews, B.M.; Doig, P.; Hancock, R.E.; Trust, T.J. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun.* 2000, 68, 4155-68. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4155-4168.2000>
13. Worst, D.J.; Otto, B.R.; de Graaff, J. Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect Immun.* 1995. 63, 4161-5.

ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA EN EL RÍO QUERÉTARO

Dulce María Orozco Corona¹, Juan José García Escalante¹, José Luis Correa Figueroa² Jesús Salvador Navarro Jasso², Paulina Solorzano Salgado², Consuelo Letechipía de Leon¹, Héctor Rene Vega Carrillo¹, Luis Alberto Carmona Martínez²

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, ²Universidad Tecnológica de Querétaro.
dulceorozco@uteq.edu.mx

RESUMEN

La contaminación antropogénica de aguas naturales es uno de los problemas actuales más preocupantes en zonas urbanas que requieren atención prioritaria debido al impacto negativo que ocasiona en la biodiversidad, el desarrollo económico y la salud de las personas. El río Querétaro tiene una extensión de 42.6 kilómetros y atraviesa los municipios de Corregidora, Querétaro y El Marqués, actualmente presenta problemas críticos de contaminación ambiental derivados de descargas no reguladas procedentes de viviendas, empresas y ranchos ganaderos y de residuos que flotan en el agua, así como la acumulación de basura a su paso por el mismo provocando posibles casos de infección y malos olores. El objetivo de la presente investigación fue analizar la concentración de 9 parámetros (dureza, fluoruro, nitratos, nitritos, pH, Cu, Cr, Fe y Pb) presentados en el agua del río Querétaro por lo tanto se procedió a muestrear un área de 19 Km, un total de 39 muestras de agua fueron tomadas cada una de ellas a una distancia aproximada de 500 metros. Para la toma de muestras de agua se tomaron como referencia la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015, NNX-AA-051-SCFI-2001 y NMX-AA-003-1980.

Una vez tomada la muestra se procedió a cuantificar la concentración de las distintas características (dureza, fluoruro, nitratos, nitritos y pH) y de los metales (Cr, Fe y Pb) en mg/L para ello, se aplicó la técnica de colorimetría por medio de tiras reactivas con medición de 14 parámetros, de los cuales los 8 parámetros analizados presentaban los siguientes rangos: dureza (25-1000 mg/L), fluoruro (0-200 mg/L), nitratos (0-500 mg/L), nitritos (0-80 mg/L), pH (6-9), Cr (2-100 mg/L), Fe (0-500 mg/L) y Pb (0-500 mg/L). Los resultados se compararon con los límites máximos permisibles establecidos por las normativas mexicanas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-001-SEMARNAT-1996. El objetivo de la presente investigación fue analizar la concentración de 8 parámetros de calidad de agua (dureza, fluoruro, nitratos, nitritos, pH, Cr, Fe y Pb) presentes en el agua del Río Querétaro comparando la concentración de estos con los límites establecidos por las normativas nacionales con el fin de detectar el nivel de contaminación del Río Querétaro. Los mapas se hicieron exportando los datos de las muestras obtenidas en físico. Se modificó y se procesó en código R. Para encontrar una relación de cantidades de contaminantes en los diferentes tramos y encontrar si hay diferencia en cada uno de los tramos. También se realizó una regresión para encontrar la relación de cada uno de los contaminantes con los demás elementos analizados. Respecto a la norma NOM-127-SSA1-1994, ninguna de las muestras superó el valor establecido para la dureza. Sin embargo, el porcentaje de muestras que superaron los límites establecidos fue de 74.35% para el fluoruro, 61.53 nitratos, 56.41% para los nitritos, 17.95% para el valor de pH, 100% de las muestras de Cr, 20.51% de las muestras de Fe y 76.92% de las muestras de Pb. Respecto a la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 el 69.23% superaron los límites permisibles para cianuros, el 76.92% para el Pb y el 87.17% para el Cr. Esta información nos permite comprobar la importancia del monitoreo del agua y tomar medidas de mitigación o remediación de áreas contaminadas, así como prevenir problemas ambientales y de salud a corto y largo plazo.

Palabras claves: Contaminación de agua, Río Querétaro, Monitoreo de la calidad del agua.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un tema alarmante y de gran trascendencia a nivel mundial puesto que es un fenómeno que afecta directa o indirectamente la salud y bienestar de ecosistemas y de personas [1].

El rápido crecimiento de los sistemas urbanos e industriales, ha traído consigo diferentes problemas ambientales relacionados con la producción de desechos, la afectación de los ecosistemas acuáticos

y terrestres, las numerosas emisiones atmosféricas con sus impactos sobre la calidad del aire, agua y la atmósfera [2].

La contaminación es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del aire, la tierra o el agua, que puede afectar nocivamente la vida humana o la de especies beneficiosas, los procesos industriales, las condiciones de vida del ser humano y puede malgastar y deteriorar los recursos naturales renovables. Los elementos de contaminación son los residuos de las actividades realizadas por el ser humano organizado en sociedad. La contaminación aumenta, no sólo a medida que la gente se multiplica y el espacio se hace más pequeño, sino también porque las demandas por persona crecen continuamente, de modo que aumentan los desechos cada año [3].

El agua, es una sustancia imprescindible para la vida, por sus múltiples propiedades y es ampliamente utilizada en actividades diarias tales como la agricultura (70% al 80%), la industria (20%), el uso doméstico (6%), entre otras, convirtiéndose en uno de los recursos más apreciados en el planeta. De ahí la importancia de conservar y mantener la calidad de las fuentes naturales, de manera que se garantice su sostenibilidad y aprovechamiento para las futuras generaciones [4].

El acelerado crecimiento urbano y los procesos de desarrollo industrial requerirán de medidas especiales de atención y grandes inversiones para contrarrestar los efectos de la contaminación sobre la población, los ecosistemas y el planeta en general. Según el Banco Mundial, cerca de mil millones de personas están afectadas por la contaminación tóxica producida por actividades industriales. La contaminación ambiental y los residuos tóxicos son resultados del desarrollo industrial, concebido como sinónimo del progreso, siendo estos últimos una de las mayores fuentes de contaminación del agua, suelo y aire [5].

El objetivo de la presente investigación fue analizar la concentración de 8 parámetros de calidad de agua (dureza, fluoruro, nitratos, nitritos, pH, Cr, Fe y Pb) presentes en el agua del Río Querétaro comparando la concentración de estos con los límites establecidos por las normativas nacionales con el fin de detectar el nivel de contaminación del Río Querétaro.

PARTE EXPERIMENTAL

Descripción del área de estudio

El estado de Querétaro colinda al norte con el estado de Guanajuato y el municipio de El Marqués; al este con el municipio de El Marqués; al sur con los municipios de Huimilpan, Corregidora y el estado de Guanajuato; al oeste con el estado de Guanajuato. A nivel estatal la actividad que más aporta al Producto Interno Bruto es el comercio aportando un 2.2% a nivel nacional. Además, las industrias manufactureras juegan un papel importante dentro de la producción bruta total del estado siendo en promedio de 66.3% [6].

Dentro del estado de Querétaro, el Río Querétaro atraviesa los municipios de Corregidora, Querétaro y el Marqués y 21 km en el municipio de Querétaro, este Río presenta serios problemas de contaminación ambiental provocado tanto por residuos industriales, agrícolas, mineros, así como a la tira de basura indiscriminada por parte de la población siendo un gran peligro latente para el medio ambiente, los ecosistemas cercanos y la población en general pudiendo generar problemas de salud [6].

Dado el historial de contaminación del Río Querétaro, este trabajo se realizó muestreando la calidad del agua en un área de 19 km sobre el mismo.

La figura 1 muestra la ubicación del sitio de muestreo donde se realizaron los distintos muestreos.

Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo



Toma de muestras, preparación de muestras y análisis de parámetros.

Para la toma de muestras se consideró una extensión del río de 19 km para ello un total de 39 muestras fueron analizadas, cada muestra se tomó aproximadamente a una distancia de 500 metros respecto a la muestra anterior. El muestreo se hizo tomando como referencia las normas mexicanas NMX-AA-034-SCFI-2015, NNX-AA-051-SCFI-2001 y NMX-AA-003-1980. Se tomaron 250 ml de agua por muestra directamente del Río Querétaro, como punto de partida del muestreo se tomó la primera muestra a las afueras de la empresa Agrogen ubicada sobre la carretera Tlacote se continuó sobre la parte del Río Querétaro que pasa por la avenida 5 de febrero posteriormente Bernardo Quintana hasta llegar al parque 2000. Cada una de las muestras se etiquetaron y almacenaron en envases de polietileno previamente tratados con una solución de HNO_3 al 10% durante 1 hora. Se filtraron en una membrana Whatman de poro de 0.45 micras finalmente se refrigeraron a 4°C hasta su análisis.

Posteriormente, en el laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental ubicado en la Unidad Académica de Ingeniería Civil en la Universidad Autónoma de Querétaro, el pH se midió utilizando un medidor de PH meter digital cada muestra se filtró con una membrana Whatman de poro de 0.45 micras y se refrigeraron a 2°C . Para el análisis de los parámetros se aplicó la técnica de colorimetría por medio de tiras reactivas marca Test Strips con medición de 14 parámetros, de los cuales los parámetros analizados presentaban los siguientes rangos: dureza (25-1000 mg/L), fluoruro (0-200 mg/L), nitratos (0-500 mg/L), nitritos (0-80 mg/L), Cu (0-300 mg/L), Cr (2-100 mg/L), Fe (0-500 mg/L) y Pb (0-500 mg/L). 3 veces y se obtuvo el promedio por muestra.

Límites máximos permisibles de metales pesados en aguas naturales

La siguiente tabla 1 muestra los límites máximos permisibles en parámetros de agua, tomando como referencia las normativas mexicanas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-001 SEMARNAT-1996:

Tabla 1. Límites máximos permisibles en parámetros de agua

Parámetro	Normativa o referencia	Límite máximo permisible
Dureza	NOM-127-SSA1-1994	500 mg/L
Fluoruro	NOM-127-SSA1-1994	1.50 mg/L
Nitratos	NOM-127-SSA1-1994	10 mg/L
Nitritos	NOM-127-SSA1-1994	0.05 mg/L
pH	NOM-127-SSA1-1994	6.5-8.5
Cu	NOM-001-SEMARNAT-1996	6 mg/L
	NOM-127-SSA1-1994	2 mg/L
Cr	NOM-001-SEMARNAT-1996	1 mg/L
	NOM-127-SSA1-1994	0.05 mg/L
Fe	NOM-127-SSA1-1994	0.30 mg/L
Pb	NOM-001-SEMARNAT-1996	0.4 mg/L
	NOM-127-SSA1-1994	0.025

Análisis estadísticos

Para el manejo de los datos, se aplicó un análisis estadístico descriptivo de indicadores de tendencia central y de dispersión. Los mapas fueron generados. Los mapas se hicieron exportando los datos de las muestras obtenidas en físico. Se modificó y se procesó en código R. Para encontrar una relación de cantidades de contaminantes en los diferentes tramos y encontrar si hay diferencia en cada uno de los tramos. También se realizó una regresión para encontrar la relación de cada uno de los contaminantes con los demás elementos analizados.

RESULTADOS

En la presente sección se muestran los resultados obtenidos de la concentración de los distintos parámetros analizados en agua procedentes del Río Querétaro en la ciudad de Querétaro. Los resultados presentados fueron comparados con las normativas nacionales NOM-127-SSA1-1994 y NOM-001 SEMARNAT-1996 después de haber realizado la caracterización de los parámetros con el objetivo de comparar si los parámetros están o no dentro de esos límites.

Tabla 2. Dureza de agua y Ph encontradas en las muestras analizadas.

Dureza (mg/L)	Frecuencia absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)	pH	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
0-24	2	5.13	5.13	6	7	17.95	17.95
25-49	23	58.97	64.10	6.5	6	15.38	33.33
50-74	13	33.33	97.44	7	5	12.82	46.16
75-99	0	0.00	97.44	7.5	14	35.90	82.05
99-123	1	2.56	100	8	7	17.95	100
Total	39	100		Total	39	100	

Conforme a los resultados de la dureza tabla 2, ninguna de las muestras excedió el valor máximo permitido de 500 mg/L que establece la norma NOM-127-SSA1-1994, la media encontrada de la dureza en las muestras analizadas fue de 45.94 ± 17.56 mg/L. Las aguas que contienen mayor cantidad de bicarbonatos de calcio y de magnesio, representa la principal forma de alcalinidad, y en algunos casos, es equivalente a la dureza carbonatada o total, que es igual a la temporal, o que produce incrustaciones o almacenamientos leves que se pueden remover mediante inyecciones de aire o agua a presión. La dureza se refleja más en aguas subterráneas, que en aguas superficiales como la de los ríos, ya que por lo general estas arrastran más minerales como calcio y magnesio que aumentan la dureza [7]. La dureza total y la presencia de calcio y magnesio en el agua, estos son parámetros importantes que se deben controlar, ya que su cuantificación determina la potabilidad del agua, debido a que la presencia de iones de calcio y magnesio en exceso puede producir problemas cardiovasculares [8].

La norma mexicana NOM-127-SSA1-1994 determina que el rango de valores permitidos para el pH es de 6.5-8.5, de las muestras analizadas 7 de ellas tienen valores menores a estos rangos, es decir el 17.95% de las muestras, el promedio del pH en las muestras analizadas fue de 7.10 ± 1.18 . Los pH menores de 7 indican una acidez mayor, mientras que mediciones mayores a 7 representan mayor alcalinidad, el pH a su vez puede ser un indicador de contaminación en agua y afectar directamente a los organismos vivos. Cabe mencionar que las aguas contaminadas con metales pesados y con baja movilidad hídrica reducen la movilidad de los metales pesados en el suelo, lo que podría ser un factor determinante para reducir la contaminación posterior por lixiviación [9].

Tabla 3. Concentraciones de Fe encontradas en las muestras analizadas

Hierro (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
0-4.9	29	74.36	74.36
5-9.9	4	10.26	84.62
10-14.9	6	15.38	100.00
Total	39	100	

El valor promedio de la concentración de Fe encontrado en las muestras analizadas fue de 4.50 ± 3.75 mg/L, la norma NOM-127-SSA1-1994 menciona un valor límite de 0.30 mg/L el 20.51% de las muestras superaron los valores límites establecidos encontrándose valores máximos de 10 mg/L en 10 de ellas. Si bien el Fe no causa problemas de toxicidad ni daños a la salud si causa problemas en el uso del agua, el hierro cuando sus valores exceden ciertos límites se acumula en los tubos de las cañerías, restringe el flujo de agua y reduce la presión de la misma además forma bacterias que ocasionan una baba rojiza-café en los sistemas de agua [10].

Tabla 4. Concentraciones de Nitrito y Cromo en las muestras analizadas

Nitrito (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)	Cromo (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
0-9.99	34	87.18	87.18	0-19.99	36	92.31	92.31
10-19.99	3.00	7.69	94.87	20-39.99	2	5.13	97.44
20-29.99	1.00	2.56	97.44	40-59.99	0	0.00	97.44
30-39.99	0	0.00	97.44	60-79.99	0	0.00	97.44
40-49.99	1.00	2.56	100	80-99.99	0	0.00	97.44
				100-119.99	1	2.56	100
Total	39	100		Total	39	100	

Referente a las concentraciones de nitratos y nitritos (tabla 6 y tabla 4) los límites máximos de la norma NOM-127-SSA1-1994 son de 10 mg/L y 0.05 mg/L respectivamente, 24 de las 39 muestras superaron a la norma para el caso de los nitritos esto es el 61.53 % siendo la concentración máxima de una de ellas de 40 mg/L, la concentración media del total de las muestras analizadas fue de 7.30 ± 7.42 mg/L. Para los nitratos la norma menciona valores superiores a 10 mg/L como no permisibles 22 de las 39 muestras superaron estos valores es decir 56.41% de las muestras, la media general de las muestras analizadas fue de 118.58 ± 165.9 mg/L. Los nitratos y nitritos pueden ser originados tanto por fuentes naturales como antropogénicas, siendo en estas últimas las actividades industriales las que constituyen la principal fuente de nitratos en agua superficial, sin embargo, las emisiones a nivel industrial suelen ser muy controladas y puntuales. Los nitratos no son tóxicos ya que son eliminados por el riñón, pero pueden llegar a reducirse a nitritos los cuales se absorben en los glóbulos rojos de la sangre, oxidando el hierro de la hemoglobina a metahemoglobina, disminuyendo la capacidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno. Adicionalmente, algunos tipos de cáncer gastrointestinal se atribuyen a compuestos nitrosos [11, 12].

El 100% de las muestras de Cr superaron los límites establecidos por las normas NOM-001 SEMARNAT-1996 y NOM-127-SSA1-199. La media total de Cr fue de 13.58 ± 16.46 mg/L. El uso principal de Cr se encuentra en las industrias metalúrgica, refractaria y química. La mayor proporción de Cr se utiliza para el cromado y el acero inoxidable siendo la principal fuente de contaminación por Cr en agua la proveniente de colorantes cuando los desechos se descargan directamente en las corrientes de los desechos [13]. El contenido de Cr en las plantas ha recibido recientemente mucha atención debido al conocimiento de su importancia como micronutriente esencial en los procesos metabólicos humanos, pero también debido a sus efectos cancerígenos, aunque su movilidad química y transporte son relativamente bajos es de importancia el controlar su emisión [14].

Tabla 5. Concentraciones de Fluoruro en las muestras de agua analizadas

Fluoruro (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)	Fluoruro (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
0-24.99	11	28.21	28.21	125-149.99	0	0.00	92.31
25-49.99	17	43.59	71.79	150-174.99	1	2.56	94.87
50-74.99	4	10.26	82.05	175-199.99	0	0	94.87
75-99.99	0	0.00	82.05	200-224.99	2	5.13	100
100-124.99	4	10.26	92.31				
Total	36	92.30%			4	7.69%	

Las muestras analizadas para el parámetro de Fluoruro encontraron una media de 52.88 ± 51.17 mg/L, 29 de las 39 muestras superaron los valores establecidos esto es 74.35%. En México, se ha investigado que aproximadamente más de 5 millones de habitantes están crónicamente expuestos a Fluoruros en altas concentraciones en el agua [15]. Su exposición prolongada provoca fluorosis dental y esquelética, enfermedades renales, cáncer y afectaciones en el desarrollo del cerebro y el coeficiente intelectual de niños [16].

Tabla 6. Concentración de Nitrato en las muestras de agua analizadas.

Nitrato (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Nitrato (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)
0-49.99	27	69.23	250-299.99	6	15.38
50-99.99	1	2.56	300-349.99	0	0.00
100-149.99	1	2.56	350-399.99	0	0.00
150-199.99	0	0.00	400-449.99	0	0.00
200-249.99	0	0.00	450-499.99	0	0.00
			500-549.99	4	10.26
Total	29	74.35%	Total	10	25.64%

Tabla 7. Concentración de Pb en las muestras de agua analizadas.

Plomo (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)	Plomo (mg/L)	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
0-9.9	9	23.08	23.08	130-139.99	0	0.00	92.31
10-19.99	0	0.00	23.08	140-149.99	0	0.00	92.31
20-29.99	16	41.03	64.11	150-159.99	0	0.00	92.31
30-39.99	0	0.00	64.11	160-169.99	0	0.00	92.31
40-49.99	0	0.00	64.11	170-179.99	0	0.00	92.31
50-59.99	8	20.51	84.62	180-189.99	0	0.00	92.31
60-69.99	0	0.00	84.62	190-199.99	0	0.00	92.31
70-79.99	0	0.00	84.62	200-209.99	2	5.13	97.44
80-89.99	0	0.00	84.62	210-219.99	0	0.00	97.44
90-99.99	0	0.00	84.62	220-229.99	0	0.00	97.44
100-109.99	3	7.69	92.31	230-239.99	0	0.00	97.44
110-119.99	0	0.00	92.31	240-249.99	0	0.00	97.44
120-129.99	0	0.00	92.31	250-259.99	1	2.56	100
Total	36	92.30%		Total	3	7.69%	

Los resultados de Pb (tabla 7) muestran una concentración promedio de 47.80 ± 57.9 mg/L, solamente 9 de las 39 muestras no superaron las concentraciones establecidas por las normas NOM-001-semarnat-1996 y NOM-127-SSA1-1994 es decir 76.92% de las muestras superaron los límites. La química de Pb en sistemas acuosos es altamente compleja porque este elemento existe en formas múltiples. Las concentraciones de Pb en aguas superficiales dependen especialmente del pH y el contenido de sal disuelta del agua. Factores adicionales, como la contaminación las fuentes, el contenido de Pb del sedimento, la temperatura y los tipos y cantidades de materia orgánica tienen también un impacto significativo en el estado de Pb en aguas [17]. La exposición al Pb en cantidades muy pequeñas afecta a niños y adultos, causando problemas digestivos, crecimiento retardado y desarrollo del sistema neurológico lento a mayores cantidades convulsiones, colapsos e incluso la muerte además ocasiona anemia en niños y adultos al impedir la formación de moléculas que transportan el oxígeno [18].

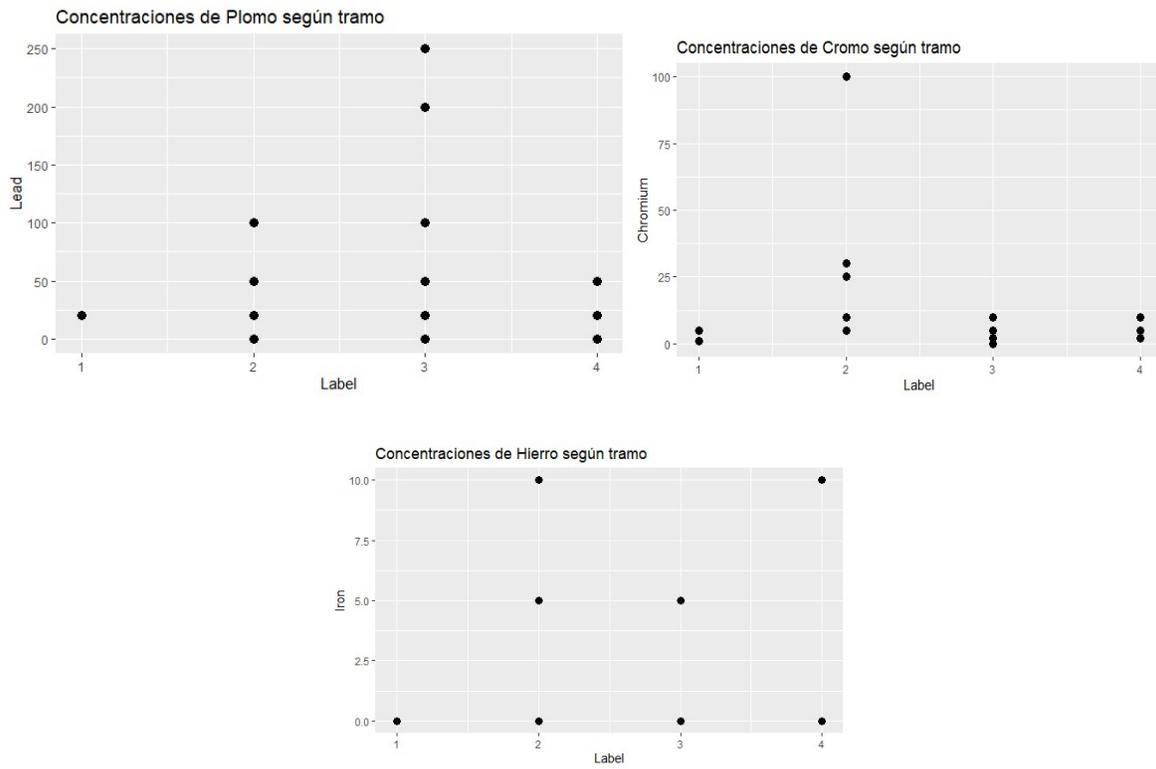


Figura 2. Concentraciones de Pb, Cr y Fe según los tramos analizados.

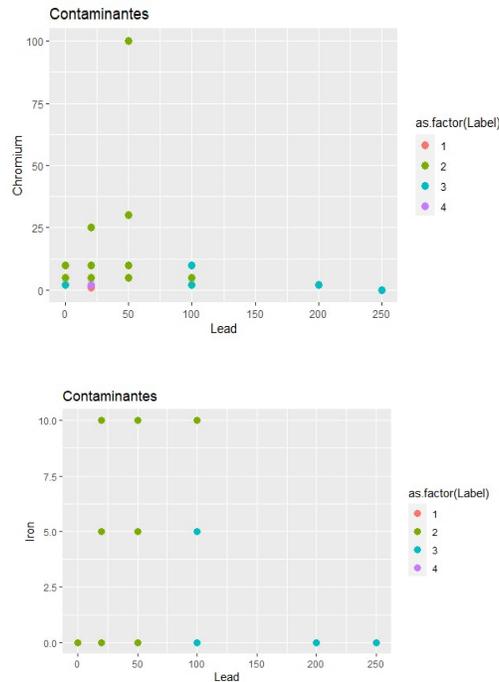


Figura 3. Relación entre los principales contaminantes analizados en el agua del Río Querétaro.

La figura 2 muestra las concentraciones de los principales contaminantes, Plomo, Hierro y Cromo. Los tramos se refieren al tramo del Río Querétaro que se midió, siendo el tramo 1 desde la Presa "del Diablo" a la Av. Bernardo Quintana, el tramo 2 desde Bernardo Quintana hasta Av. 5 de febrero, el tramo 3 desde Av. 5 de febrero hasta la empresa Agrogen y el tramo marcado como 4 está ubicado en la presa del Parque Querétaro 2000.

Adicionalmente se calculó la relación entre los principales contaminantes, la figura 3 muestra la relación que existe entre los contaminantes más dañinos Plomo, Hierro y Cromo. Donde podemos observar que a menor cantidad de Plomo hay mayor cantidad de Cromo y mayor cantidad de Hierro.

CONCLUSIONES

En las pruebas se analizaron 39 muestras provenientes del Río Querétaro, los análisis evidenciaron distintos resultados de acuerdo a la ubicación de la toma de muestras. La finalidad del estudio fue comparar las concentraciones de los distintos parámetros utilizando como referencia las normativas mexicanas para comparar las concentraciones para los distintos parámetros se utilizaron como referencia las normativas mexicanas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-001-SEMARNAT-1996.

Se aplicó la técnica de colorimetría por medio de tiras reactivas para el análisis de los distintos parámetros. Las concentraciones fueron lo suficientemente precisas para los objetivos de esta labor de investigación encontrándose muy superior a los establecidos en algunos parámetros y a su vez muy variantes respecto a la ubicación de las distintas muestras. Una vez determinadas las concentraciones, se realizó un análisis estadístico para obtener la concentración media y desviación estándar por parámetro, gracias a ello fue posible evaluar y documentar los cambios en las pautas de movilidad de los metales pesados.

De acuerdo a los resultados ningún valor excedió los límites permitidos para el parámetro de la dureza, para el pH solamente el 17.95% de las muestras, 20.51% en el caso del Fe, 61.53% para los nitratos, 56.41% para los nitritos sin embargo para el parámetro de Cr el 100% de las muestras superaron los límites establecidos, el 74.35% para el fluoruro y el 76.92% para el Pb.

El conocimiento de la concentración de metales pesados permite tomar decisiones ambientales sobre el lugar de estudio. Debido a la importancia que representa actualmente la seguridad alimentaria como aspecto esencial de la salud pública en todo el mundo y como instrumento de prevención, se recomienda vigilar la zona y realizar actividades de reparación.

Es fundamental seguir con el estudio y monitoreo constante de las concentraciones de parámetros de agua en el Río Querétaro mediante una red de monitoreo y de población expuesta. Del mismo modo, hacer uso de la información para la toma de decisiones a nivel regional y nacional, ya sea para actualizar y revisar las normas mexicanas actuales, así como el diseño de programas y políticas para reducir la exposición a contaminantes consolidando grupos de investigación y docencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Y.C., Reyes, "Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria", J.Ing. Inv. Des., Vol. 16, 2, 2016, pp. 66-77.
2. L.F., Molina-Prieto, Gestión urbana del recurso pluvial: estrategias, políticas y normativa urbana en cinco países europeos", J.Inv., Vol. 8, 1, 2015, pp.125-138.
3. A.F., Moreira-Romero, "Contaminación del aire en el medio ambiente por las emisiones de gases tóxicos de empresas industriales en Ecuador". J. Pol. Con., Vol.3, 7, 2018, pp.273-280.
4. A., Gómez-Gutiérrez, "Drinking water quality and safety", J. Gac. San., Vol. 30, 1, 2016, pp. 63-68.
5. M., Haseena, "Water pollution and human health", J. Envir Ris. Ass., Vol. 1, 3, 2017, pp. 16-19.
6. INEGI, "Anuario estadístico y geográfico del estado de Querétaro 2017", Inst. Nacional de Estadística y Geografía, 2017, México, pp. 1-451.

7. E., Pérez-López, "Control de calidad en aguas para consumo humano en la región occidental de Costa Rica", *J. Tec. Mar.*, Vol. 29, 3, 2016, pp. 3-14.
8. R., Galvin, "Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas", 2003, Madrid: Editorial Díaz Santos.
9. M.H., Banna, "Miniaturized water quality monitoring pH and conductivity sensor", *J. Sens. Act. Chem.*, Vol. 193, 31, 2014, pp. 434-441.
10. Z., Tesfamariam, "Assesment of physicochemical parameters and levels of heavy metals concentration in drdinking water of Asmara city, Eritrea III", *J. Res. Com.*, Vol. 4, 8, 2016, pp. 30-44.
11. ATSDR, "Posibles efectos en la salud relacionados con nitratos y nitritos en agua de pozos privados", *Inv. Sal. Amb.*, 2006, California, pp. 1-4.
12. A., Wild, "Nitrate in drinking water: health hazard unlikely" *J. Nat.*, Vol. 268, 5617, 1977, pp. 197-199.
13. A., Zhitkovich, "Chromium in drinking water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks", *J. Chem. Res. Toxicol.*, Vol 24, 10, 2011, pp 1617-1629.
14. A.H., Smith, "Health Effects of Arsenic and Chromium in Drinking Water: Recent Human Findings", *Rev. Pub. Health.*, Vol. 30, 1, 2009, pp. 107-122.
15. L., Galicia-Chacon, "Analysis of drinking water fluoride concentration in Tlahuac, Mexico City", *J. Int. Contam. Ambient.*, Vol. 27, 4, 2011, pp. 1-5.
16. S.X., Wang, "Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China", *J. Environ. Health Perspect*, Vol. 15, 2, 2007, pp. 643-647.
17. K. Pendias, "Trace Elements from Soil to Human", 2007, Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-550.
18. K.J., Piper, "Evaluating water lead levels during the flint water crisis", *J. Environ. Sci. Technol.*, Vol 52, 15, 2018, pp. 8124-8132.

RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS QUÍMICOS Y CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN SUELOS DE LA RIVERA DEL LAGO DE CUITZEO

Mariela Casillas Corona, María Álcala De Jesús, Isabel Israde Alcántara

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
mari_liz87@msn.com.

RESUMEN

La contaminación por elementos traza (ET) cada día es más frecuente y ocasiona daños al medio ambiente y a la salud. En la rivera del Lago de Cuitzeo se presentan problemas de salud como infecciones respiratorias y dermatológicas derivados por Tolvaneras durante la época de estiaje. Se colectó polvo en los meses de estiaje de tres localidades del municipio de Copándaro Michoacán (Santa Rita, San Agustín del Maíz y Copándaro) con el objetivo de realizar una caracterización química y el contenido de ET en polvos provenientes de las Tolvaneras. Los análisis realizados fueron: pH, conductividad eléctrica (CE), Materia Orgánica (MO), La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC); se determinó el contenido de As, Cd, Cr, Cu, Ni, Fe, Pb y Zn por absorción atómica. El pH varía de neutro 6.83 a fuertemente alcalino 8.14, la CE es de efectos depreciables de salinidad (0.102 dS m^{-1} – 1.048 dS m^{-1}) y en menor proporción salinos (5.55 dS m^{-1} a 6.16 dS m^{-1}) la MO es de clase muy baja (0.10%) a muy alta (9.7%). La CIC es de clase media ($18.06 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$) a muy alta ($44.72 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$) predominan valores en promedio de $25 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$ las clases de CIC más altas se encontraron en santa Rita en la mayoría de los sitios a mayor contenido de MO mayor CIC. El As se encontró en los polvos de las tres localidades en concentraciones bajas ($0.0011 \text{ mg Kg}^{-1}$ a $0.0039 \text{ mg Kg}^{-1}$). Las concentraciones más altas de ET en polvos se registraron de la siguiente manera: Ni en (0.129 mg Kg^{-1}), Cu (0.163 mg Kg^{-1}), Fe (1.17 mg Kg^{-1}) y Zn (1.46 mg Kg^{-1}). El Pb, Cd y Cr no se presentaron en ningún polvo. Los polvos pueden llegar a ser responsables de impactos ambientales y ocasionar graves problemas de salud al estar en contacto directo con las personas principalmente si contiene ET; aunque las concentraciones de los ET son muy bajas, estos pueden ser los principales causantes de la problemática de salud en las localidades.

INTRODUCCION

La contaminación por Elementos Traza (ET) en los suelos es un problema que se presenta a menudo y que actualmente provoca daños en el ecosistema y en la salud humana; se considera a las actividades antrópicas como una de las principales e importantes fuentes de contaminación.

Los residentes de la cuenca del Lago de Cuitzeo señalan que su salud es afectada por la problemática ambiental del Lago. Cabe señalar que existe un consenso el cual afirma que los responsables de la salud de las poblaciones son un conjunto de factores complejos (políticas públicas características individuales, factores sociales y económicos, y el entorno físico) que al actuar de manera combinada determinan los niveles de salud de los individuos y de las comunidades (Romero *et al.*, 2007).

En la cuenca del Lago de Cuitzeo son comunes las infecciones de piel, irritación de ojos y de vías respiratorias que se detectan con mayor frecuencia en la época de estiaje cuando se presentan las tolvaneras con partículas que provienen de los sedimentos superficiales del lago y que posiblemente llevan consigo ET como el Cr, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn y el metaloide As que pueden ser los responsables de los problemas de salud antes mencionadas. Los ET y el metaloide también pueden estar presentes en el agua potable y en las aguas residuales, cuyo drenaje se encuentra a cielo abierto en las comunidades y va directo al lago, ésto por carecer de plantas tratadoras; sumado a lo anterior, es conocido que las principales vías de ingreso de los metales hacia los seres humanos son a través del agua, polvo y alimento (Nava-Ruíz *et al.*, 2011).

En la desembocadura de las descargas urbanas que provienen de la ciudad de Morelia y se dirigen al Lago de Cuitzeo se han reportado ET en agua y en sedimentos, así como su toxicidad en concentraciones que no sobrepasan el límite permisible de las normas oficiales Mexicanas (Alfaro, 2010; Villalobos-Castañeda *et al.*, 2010). Así misma caracterización fisicoquímica de los ET y del As en agua y en sedimentos del lago (Kram-Heydrich *et al.*, 2010); El objetivo de este trabajo fue realizar

una caracterización química y el contenido de ET en polvos provenientes de las Tolvaneras en el Municipio de Copándaro, Michoacán.

PARTE EXPERIMENTAL

La zona de estudio pertenece al municipio de Copándaro de Galeana en la cuenca del Lago de Cuitzeo al norte de la ciudad de Morelia, Michoacán (Figura 1). Se encuentra entre las coordenadas geográficas 19°51' y 19°59' de latitud norte y, 101°08' y 101°18' de longitud oeste en una altitud promedio de 1900 m; ocupa 0.29% de la superficie del estado de Michoacán. Colinda al norte con el Lago de Cuitzeo y a su vez, al norte de Cuitzeo, con los municipios de Huandacareo y Cuitzeo; al este, con Cuitzeo y Tarímbaro; al sur, con Tarímbaro y Morelia; y al oeste, con Morelia, Chucándiro y Huandacareo (PIGM, 2009).



Figura 1. Localización del área de estudio.

Los sitios de muestreo incluye a Copándaro como cabecera municipal, San Agustín y Santa Rita, los dos últimos, localizados a 4 km al oriente y 3 km al poniente de Copándaro, respectivamente. En estas localidades se tomaron muestras de suelo y polvos.

Para coleccionar el suelo, se hicieron 10 cortes o perfiles de 30 cm de alto por 30 cm de ancho y con la ayuda de una pala se coleccionó aproximadamente 0.5 kg de cada uno de los horizontes y se colocaron en bolsas de plástico. El polvo se coleccionó en un área de 1.0 m² en las azoteas de seis sitios con el apoyo de una brocha de cerdas finas de acuerdo con la técnica utilizada por Bautista *et al.* (2007) las muestras de polvo se guardaron en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio para su posterior análisis.

Los análisis se realizaron de la siguiente manera:

Conductividad eléctrica y pH Se determinaron en una relación suelo agua 1:2.5 medidos en potenciómetro marca Conductronic PC 45 y en un conductivímetro marca APHA-AWWA-WPCF, 1995; Materia orgánica. Se realizó mediante el método de combustión húmeda de Walkley y Black. La Capacidad de intercambio catiónico. Por el método del acetato de amonio que consiste en la saturación del complejo coloidal del suelo, mediante el lavado sucesivo con soluciones salinas y éstas a su vez lavadas con etanol.

Los elementos Traza Cd, Cr, Cu Ni, Fe y Pb, Zn y el metaloide As en suelo y polvos se identificaron y cuantificaron mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) previa digestión ácida, La identificación de todos los *MP* se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Analyst 2000. Además, con el fin de conocer la sensibilidad de los equipos, para los *MP* del agua potable se utilizó espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (NMX-AA-131/1-SCFI-2008).

El As se obtuvo con la técnica de AAS a partir de la generación de hidruros (DOF, 2001).

RESULTADOS

Las propiedades químicas de los suelos para el área de estudio se muestran a continuación.

Cuadro 1. Análisis físicos y químicos de los suelos del municipio de Copándaro Michoacán.

Horz	MO	pH		CE	CIC
		1:2.5	1:50		
	%			dS m ⁻¹	cmol kg ⁻¹
P1 H-1	2.6	10.1	10.0	5.55	43.00
H-2	1.2	10.0	9.83	3.75	22.36
P2 H-1	4.8	7.25	7.54	0.228	44.72
H-2	2.8	7.08	7.31	0.365	40.42
P3 H-1	4.3	6.87	7.16	0.125	42.14
H-2	3.6	6.83	7.00	0.109	39.56
P4 H-1	1.7	7.33	7.26	0.102	19.78
H-2	0.9	7.35	7.44	0.138	36.12
P5 H-1	3.9	7.42	7.57	0.118	36.98
H-2	3.6	7.63	7.56	0.231	36.12
P6 H-1	9.7	7.04	7.20	0.776	38.7
H-2	1.1	8.98	8.86	1.048	22.36
H-3	0.2	9.05	8.95	0.734	18.06
P7 H-1	2.7	7.32	7.55	0.739	24.08
H-2	9.1	7.18	7.19	0.856	34.4
P8 H-1	7.3	7.05	7.05	0.394	28.38
H-2	1.1	7.92	7.50	0.127	30.96
P9 H-1	9.3	8.12	8.03	6.16	38.7
H-2	3.1	8.54	8.55	2.69	36.12
P10	7.13	8.68	8.82	4.06	38.7

Horz = horizonte; MO = materia orgánica; CE = conductividad eléctrica; CIC = capacidad de intercambio catiónico.

pH. El pH de los suelos estudiados varía de neutros (6.83) a fuertemente alcalinos (8.14), predominando los primeros. Valores que de acuerdo con Manzione y Merrill (1989) citados en Sánchez (2003) permiten la disponibilidad de los *ET*, para el Zn y el Co el pH varía de 6.0 a 7.3 y para el Ni, de 6.5 a 8.3. Valores de pH de 6.2 a 6.9 en suelos se han reportado para la cuenca del

lago de Cuitzeo (Ortiz-Villanueva y Ortiz 2010), favorables para que el Zn y el Co sean biodisponibles. Además, Alfaro (2010) y Villalobos (2008) reportan pH de 7.0 a 10 para la cuenca del lago de Cuitzeo.

La conductividad eléctrica (CE). La mayoría de los suelos estudiados presentan efectos despreciables en salinidad (0.102 dS m^{-1} – 1.048 dS m^{-1}) y en menor proporción existen suelos salinos (5.55 dS m^{-1} a 6.16 dS m^{-1}). De acuerdo con Sánchez (2003), la salinidad de los suelos entre $650 \mu\text{Scm}^{-1}$ y $1150 \mu\text{Scm}^{-1}$ incrementa la movilización de los *ET*, además, estos aumentan la salinidad y como consecuencia, la estabilidad del suelo disminuye (Crosara, 2012).

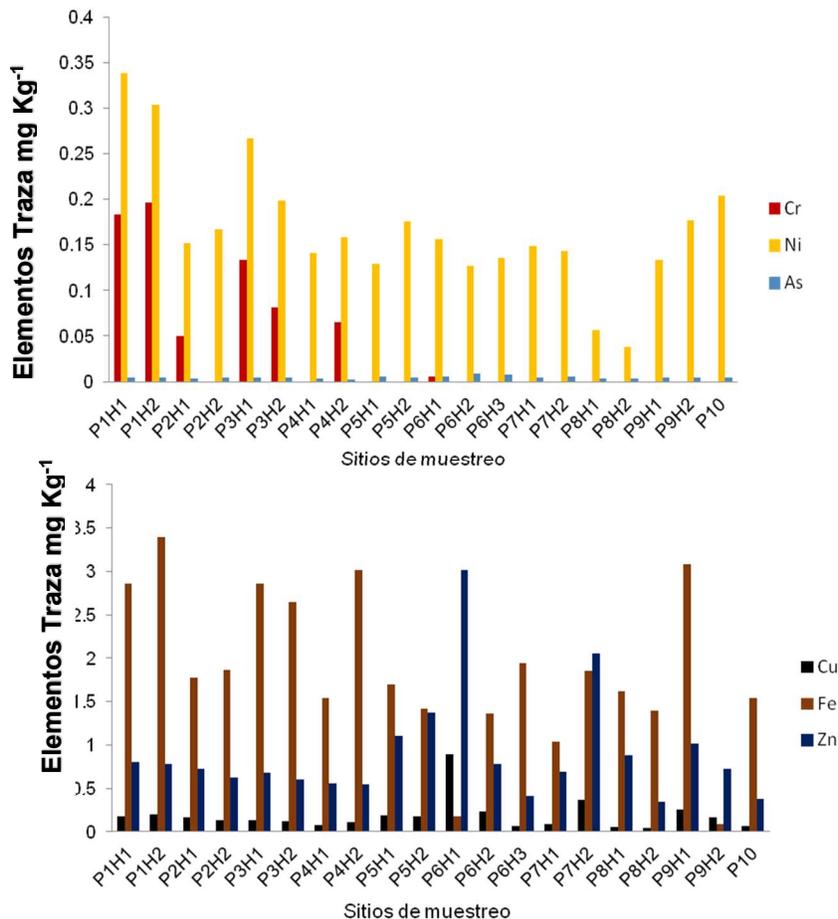
Materia orgánica (MO). La clase de MO varía de muy baja (0.10%) a muy alta (9.7%). El alto contenido de MO retiene a los *ET* ya sea mediante el intercambio catiónico o por la formación de complejos. Por una parte, la MO adsorbe a elementos tóxicos como el Cu, Pb y Ni que quedan no disponibles al formar complejos (Jaramillo, 2002; Sánchez, 2003). Por otra parte, la CIC, la MO y el pH se relacionan con una alta capacidad amortiguadora, esto significa la propiedad que tiene un suelo para resistir cambios en las concentraciones de ET en solución, es decir, mantiene a los *ET* dejándolos no disponibles por lo que a mayor capacidad amortiguadora menor será el riesgo a la exposición por ET (Ortiz-Villanueva y Ortiz 2010 y Casillas, 2011).

Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC). La CIC en los suelos estudiados varía de clase media ($18.06 \text{ cmol}_{(+) } \text{kg}^{-1}$) a muy alta ($44.72 \text{ cmol}_{(+) } \text{kg}^{-1}$), predominando valores en promedio de $25 \text{ cmol}_{(+) } \text{kg}^{-1}$ las clases de CIC más altas se encontraron en el P2 H-1 en la comunidad de Santa Rita. Entre más alto es el contenido de MO, incrementa la CIC (Ortiz-Villanueva y Ortiz 2010), relación que no se presenta en los suelos de estudio. Además, cuanto mayor sea la CIC, mayor será la capacidad del suelo para fijar ET (Sánchez, 2003).

Elementos traza

En general, los suelos estudiados del municipio de Copándaro presentan concentraciones bajas de *ET* que no rebasan los límites permisibles descritos en las normas oficiales. La concentración del As varió de 0.003 mg Kg^{-1} en el P2 H-1 a 0.009 mg Kg^{-1} en P6 H-2, respectivamente. La baja concentración de As es natural, suposición basada en lo reportado por Alfaro *et al.* (2002), Páez (2008) y Kram-Heydrich *et al.* (2010) quienes señalan que el As presente en el lago y manantiales termales localizados en el vaso este del lago es de origen natural.

El Pb no se presentó en ningún suelo. El Cr se encontró en los Perfiles 1, 2, 3, 4 y 6, la concentración más baja (0.05 mg Kg^{-1}) en el P2 H-1 y la más alta (0.196 mg Kg^{-1}) en P1 H-2. Las concentraciones mayores de cada elemento son las siguientes: Cd (0.215 mg Kg^{-1}) en el P6 H-3, Ni (0.338 mg Kg^{-1}) en el P1 H-1, Cu (0.892 mg Kg^{-1}) en el P6 H-1, Zn (2.050 mg Kg^{-1}) en el P6 H-1, y Fe (3.40 mg Kg^{-1}) en el P1 H-2 (Figura 2).



P: Perfil; H: Horizonte

Figura 2. Concentración de ET en suelos del municipio de Copándaro, Michoacán medidos por ASS.

Los sitios de mayor concentración sobre Zn y Cu son los más cercanos al lago y los de Ni, Cr y Fe se encontraron en las tres localidades. Aunque no rebasan el límite que establecen las diferentes normas, por esta razón se debe poner atención debido a que los ETson acumulables y las concentraciones pueden incrementar y estar disponibles, así mismo los pH que presentan los suelos son favorable para la absorción de algunos ET como Zn y Co.

El As presenta su mayor concentración en los suelos de San Agustín en donde el pH es alcalino, condición favorable que de acuerdo con Galán *et al.* (2010) permite que el As sea más móvil.

El Cd está presente en dos sitios y el de mayor concentración se relaciona con un alto contenido de MO, relación similar a lo reportado por Méndez-Romero *et al.* (2003). La MO es capaz de absorber el Cd para formar complejos organometálicos e inhibir la solubilidad y movilización de los ET (Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

El Cu presenta relación con el alto contenido de MO, CIC y pH alcalino. Este metal es considerado como el más móvil de los ET. Es un catión traza muy versátil y en el suelo tiene gran capacidad para interaccionar químicamente con los componentes minerales y orgánicos, al formar complejos con la MO y las arcillas hace que tenga poca movilidad en el suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

La CIC presenta una clara relación con la concentración del Ni a mayor CIC más Ni, con la materia orgánica presente en los horizontes superficiales puede estar quelatizado y con la arcilla puede formar complejos estables (Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

Elementos traza en polvos.

El metaloide As se encontró en los polvos de las tres localidades en concentraciones bajas (0.0011 mg Kg⁻¹) para POLVOC3 a 0.0039 mg Kg⁻¹ para el POLVOSA2. Las concentraciones más altas de metales pesados en polvos se registraron de la siguiente manera: Ni en (0.129 mg Kg⁻¹) POLVOC1, Cu (0.163 mg Kg⁻¹) en el POLVOSA, Fe (1.17 mg Kg⁻¹) POLVOSR3 y Zn (1.46 mg Kg⁻¹) en el POLVOC1. El Pb, Cd y Cr no se presentaron en ningún polvo (Figura 3).

Los ET en los polvos tienen relación con el contenido de tráfico vehicular y con las actividades que se realizan en los diferentes sitios. Los polvos son un factor que aumenta con el crecimiento y la dinámica de las ciudades, puede ser responsable de numerosos impactos ambientales (Trujillo-González y Torres-Mora, 2015), principalmente si contienen ET.

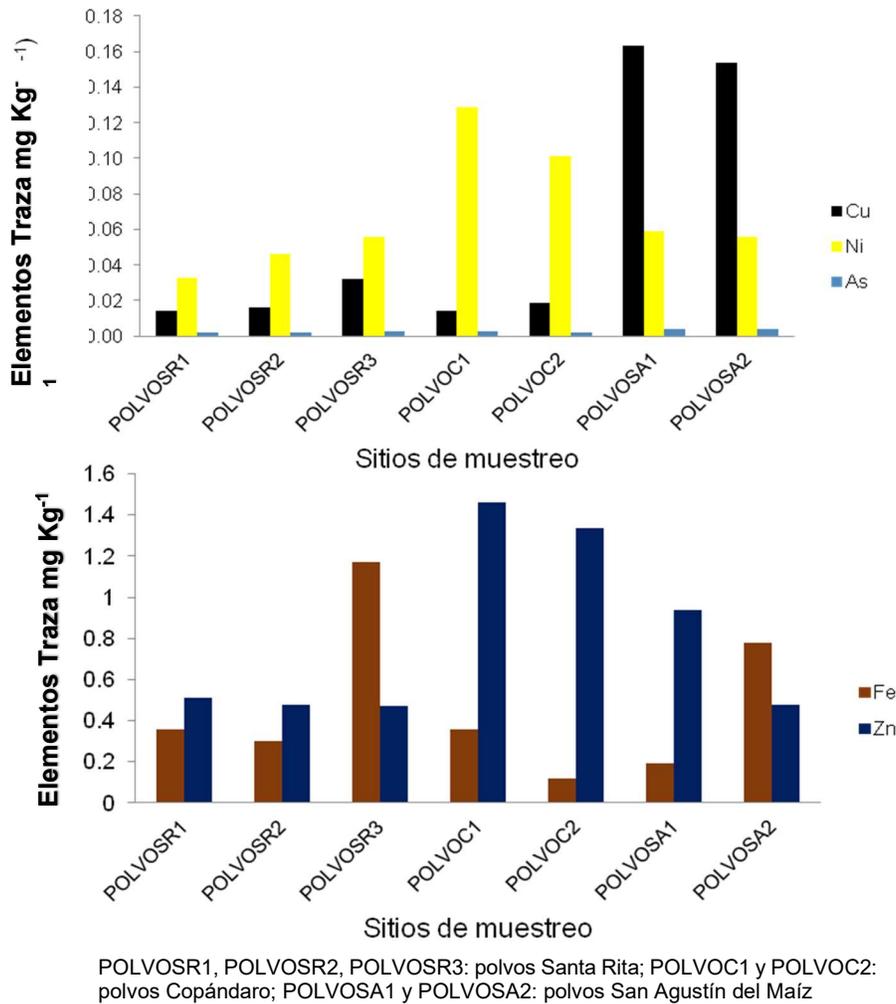


Figura 3. Concentración de ET en polvos del municipio de Copándaro, Michoacán medidos por AAS.

CONCLUSIONES

Los parámetros químicos presentan una relación con el contenido de ET en las localidades los valores tanto de pH, MO y CIC determinan la disposición o no de los ET.

La concentración de ET es más alta en suelos que en los polvos, ambas están por debajo de los límites establecidos por las normas oficiales, pero se debe prestar atención ya que los ET son bioacumulables, además aún en pequeñas cantidades pueden llegar a provocar grandes problemas de salud cuando se está expuesto a ellos lo que es el caso de la población del municipio de Copándaro, en este caso los ET que están presentes en los polvos pueden ser los responsables principales de la problemática que aqueja a las localidades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfaro R. 2010. Estudio de la movilidad y toxicidad de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del lago de Cuitzeo, Michoacán. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México.
2. Bautista-Zúñiga F. 1993. Los suelos salinos y su recuperación. *Rescate ecológico* (37): 36-39 G.
3. Bautista F., Y. Aguilar, R. Marrufo, D. Cabañas-Vargas, M. Gamboa-Marrufo. 2007. A Fast Diagnostic of urban soils contamination by heavy metals in Merida, Yucatán, México.
4. Cabrera A., L. E. Medina, M. Alcalá, J. F. Sánchez y J. M. Ayala. 2010. Suelos. pp 42-45. In: Cram S., L. Galicia, I. Israde-Alcántara. Atlas de la cuenca del lago de Cuitzeo: Análisis de su geografía y entorno socio ambiental.
5. Casillas C. M. 2011. Caracterización y Análisis Espacial de las Propiedades de Suelos Contaminados por Metales pesados. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. U.M.S.N.H.
6. Castro de Esparza M. L. 2006. Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. International congress. Mexico City, 20-24 June 2006.
7. Crosara A. 2012. El suelo y los problemas ambientales. Disponible <http://edafologia.fcien.edu.uy/archivos/Suelos%20y%20problemas%20ambientales.pdf>.
8. DOF 2003. Norma Oficial Mexicana. 2003 (23 de abril) NOM-023-SEMARNAT-2001. p 73.
9. Galán H., E y A. Romero. 2010. Contaminación del suelo por metales pesados.
10. Jaramillo J, D. F. 2002. Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Medellín. 613 pp.
11. Kabata-Pedias A., H. Pedias. 2000. Trace elements in soils and plants. CRC Michigan. USA. Disponible en http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Nowwb0xl9fYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=trace+elements++in+soil+and++plants+&ots=JHbKeg7cvw&sig=O9FRQKp3k8Yh4ZVL_-0as1UqBU#v=onepage&q=trace%20elements%20%20in%20soil%20and%20%20plants&f=false. Revisado el 26 de julio 2014.
12. Kabata-Pedías A. 2011. Trace elements in soils and plants. Fourth edition CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group, an informa business. Disponible en http://www.petronet.ir/documents/10180/2323242/Trace_Elements_in_Soils_and_Plants
13. Kram-Heydrich S., C. Ponce de León, P. Fernández-Lomelín y I. Sommer-Cervantes. 2010. Geogenic and Anthropogenic Differentiation of Potentially Toxic Elements In Superficial Sediments From Cuitzeo Lake, Mexico. *River Sediments*. pp 37-75. ISBN: 978-1-60741-437-7.
14. Machado A., N. García, C. García, L. Acosta, A. Cordova, M. Linares, D. Giradoth, y Y. Velásquez. 2008. Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni y Cr) en aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto tráfico vehicular. *Rev. Int. Contam. Ambient* 24:4 México.
15. C Nava-Ruiz y M. Méndez-Armenta. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)* Vol. 16, No. 3: 140-147.
16. Ortiz-Villanueva, B., C. A. Ortiz S. 2010. Edafología. 7ª ed. en español. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. México, D. F. V. A Gómez C (Ed).

17. Pérez G. G. 2005. Disponibilidad de metales tóxicos en sitios contaminados aplicados y limitados de la fracción en la determinación de gradientes de polución. Memoria para aspirar al grado de Doctor en Química, Universidad Autónoma de Barcelona.
18. Pérez V. J. 2008. Caracterización Hidrogeoquímica del Agua Subterránea del Valle de Querétaro para el Estudio de Sistemas de Flujo. Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de Querétaro.
19. Pérez G. P., Azcona. M. I. 2012. Los efectos del Cd en la salud. Revista de especialidades Médico-Quirúrgica México Vol.17, No. 3. pp. 199-205. ISSN: 1665-7330.
20. PIGM. (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos). 2009. Copándaro, Michoacán. Clave geoestadística 160182009.
21. Romero M, M. Álvarez y A. Álvarez. 2007. Los factores ambientales como determinantes del estado de salud de la población. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. *Versión On-line* ISSN: 1561-3003.
22. Sánchez B., M. I. 2003. Determinación de metales pesados en suelos de Medina del campo (Valladolid). Contenidos extraíbles, niveles fondo y de referencia. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Disponible en: <http://bvc.s3.dev.cervantesvirtual.com/pdfparser/0010148e-82b2-11df-acc7-002185ce6064.pdf> (Revisado el 14 de febrero de 2014).
23. Villalobos-Castañeda B., R. Alfaro-Cuevas, R. Cortés-Martínez, V. Martínez-Miranda y L. Márquez-Benavides. 2010. Distribution and Partitioning of iron, zinc, and arsenic in surface sediments in the grande river mouth to Cuitzeo lake, México. Springer Science. Eviron Monit Assess 2010. 166:331-346. DOI: 10.1007/10661-009-1005-7

POSTBIÓTICOS ENCAPSULADOS COMO INHIBIDORES *IN VITRO* DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

Valeria Alejandra Medina Ortiz, María Porfiria Barrón González, Yadira Quiñones Gutiérrez, Daniel Julio Eguiarte Lara, Bryan Guadalupe Juárez Tovar, Fabiola Lizeth Cuellar Guevara

Universidad Autónoma de Nuevo León
valeriamedort@gmail.com

RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad ocasionada por *Entamoeba histolytica*, un parásito que presenta un alto riesgo para la salud en México; este parásito posee la facultad de diseminarse en su estadio de trofozoíto a otros órganos del cuerpo y presenta farmacorresistencia, los fármacos de elección como el metronidazol y el albendazol presentan múltiples efectos secundarios indeseables al paciente. La OMS ha propuesto la búsqueda de tratamientos derivados de probióticos, ya que presentan múltiples metabolitos secundarios (también conocidos como postbióticos), entre los cuales se encuentran un grupo de proteínas llamadas bacteriocinas, las cuales poseen la capacidad de perforar la membrana celular de posibles patógenos, ocasionando su muerte. La metodología empleada en este trabajo consistió en obtener los liofilizados de los metabolitos secundarios producidos por los probióticos, los cuales reciben el nombre de postbiótico, de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, y también se obtuvieron las bacteriocinas de estas bacterias ácido-lácticas, los liofilizados fueron encapsulados conteniendo 0.5 mg/mL de postbiótico o de bacteriocina, se encapsularon empleando la técnica de alginato de sodio-calcio; posteriormente estos encapsulados fueron evaluados sobre los cultivos *in vitro* de *E. histolytica*, realizando conteos a mitad de la fase logarítmica del crecimiento del parásito. Los resultados mostraron inhibición significativa del 94% con el encapsulado de bacteriocinas de *L. casei* a [0.5 mg/L], el control empleado fue metronidazol encapsulado a la misma concentración el cual inhibió 74%. Las conclusiones nos indican que las cápsulas conteniendo las bacteriocinas o el fármaco antiamebiano son un buen acarreador y liberan bien su contenido al medio donde se encuentra el protozoario. Es decir que puede liberar su contenido a pH neutro, pero se puede investigar su liberación a otros pH para tratar de inhibir el enquistamiento de *E. histolytica* es decir inhibir el estadio de resistencia. Es recomendable continuar con el estudio del efecto de los postbióticos encapsulados, realizando la búsqueda de nuevas técnicas de encapsulación bio-dirigida y realizar la valoración *in vivo* empleando un modelo murino para evaluar la implantación y acción de los postbióticos encapsulados a nivel de intestino delgado (región de desenquistamiento) y a nivel de colon (región de enquistamiento).

INTRODUCCIÓN

E. histolytica es el patógeno intestinal causante de la amibiasis, la cual representa una de las tres primeras causas de muerte por parásitos a nivel mundial. Este parásito posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal e invadir diversos órganos vitales. A la fecha la droga de elección para el tratamiento de la amibiasis es el metronidazol, sin embargo, presenta efectos secundarios indeseables en el humano. Durante los últimos años ha adquirido gran importancia la búsqueda y aplicación de antimicrobianos de origen natural y entre ellos se encuentran los postbióticos (bacteriocinas, ácido láctico, ácidos grasos) producidos por los probióticos los cuales pueden inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos patógenos. En este trabajo se produjeron capsulas de liberación controlada las cuales contenían los postbióticos y se analizó la actividad biológica sobre *E. histolytica* mediante un modelo *in vitro* y se realizó el análisis morfológico de las células mediante microscopio de fuerza atómica (MFA). Por lo tanto, los resultados obtenidos de la investigación permitirán en un futuro diseñar y establecer estrategias y/o tratamientos encaminados al control de *E. histolytica* HM1-IMSS. Sin que estas drogas produzcan efectos secundarios indeseables en los pacientes.

TEORÍA

E. histolytica: Las enfermedades gastrointestinales son de los principales problemas de salud pública en México. Algunas de estas enfermedades tienen diferentes agentes como virus, parásitos y bacterias. Se transmiten ya sea por vía fecal-oral o por el consumo de agua y alimentos contaminados. Este problema de salud pública depende mucho del nivel socioeconómico de los pacientes, por lo tanto, el nivel de incidencia y prevalencia de estas enfermedades es mayor en aquellos habitantes con nivel socioeconómico pobre (Hernández et al. 2011).

Tratamiento para amibiasis: Agarwal et al. (2016), mencionan que el metronidazol es actualmente el fármaco preferido para tratar la amebiasis invasiva en adultos y niños, pero puede no ser suficiente para eliminar los quistes del parásito en el intestino. Aunque el metronidazol es bien tolerado y posee baja incidencia de efectos secundarios graves, aun así, es posible que se presente toxicidad neurológica, la cual es muy común con este medicamento, ya que se han reportado casos de neuropatías periféricas y de toxicidad del nervio central, además provoca cefalea, vomito, náuseas, sabor cobrizo, entre otros.

En un trabajo reportado por Pérez et al. (2001), reportan el uso de metabolitos de probióticos, en este *Lactobacillus johnsonii* para inhibir trofozoítos de *Giardia intestinalis* (un parásito patógeno para el hombre) en un modelo murino (Balb/c). Los resultados demuestran que los metabolitos (postbióticos) de *L. johnsonii* tienen un efecto inhibitorio sobre *Giardia intestinalis*.

Probióticos: El International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics en 2014, publicaron el Marco general sobre el uso y alcance apropiados del término probiótico, este consenso indica que: Se requiere evidencia de un beneficio de salud, ya sea a nivel de grupo o específico de la cepa, según la naturaleza del beneficio. Los probióticos pueden tener diferentes medios de administración, especies objetivo (humanos y animales), poblaciones objetivo, sitios objetivo (intestino y más allá), puntos finales de eficacia y categorías reguladoras. Todos los probióticos deben ser seguros para su uso previsto. Los microbios muertos, los productos microbianos, los componentes microbianos no están incluidos en la clasificación de probióticos (Hill et al., 2014).

Los productos microbianos producidos por los probióticos reciben el término de postbióticos, metabióticos, biogénicos o metabolitos/SFC (sobrenadantes libres de células) los cuales son secretados por bacterias vivas o liberados después de la lisis bacteriana (Aguilar et al. 2018). (Tsilingiri y Rescigno, 2013). Estos subproductos ofrecen beneficios fisiológicos al huésped al proporcionar bioactividad adicional (Cicenia et al. 2016). Entre los beneficios atribuidos a los probióticos están: la mejora de la salud intestinal, mejora de la respuesta inmune, reducción de colesterol, y prevención de cáncer (Kechagia et al. 2013).

Entre los microorganismos probióticos más comunes con beneficios de salud para los seres humanos se destaca el género *Lactobacillus* (Fijan, 2014). En cuanto el uso de probióticos en contra de patógenos, Reyes y Rodríguez (2012) mencionan que los probióticos previenen la colonización intestinal de microorganismos patógenos mediante la inhibición competitiva. Estos autores mostraban que los probióticos disminuyen el pH intestinal y a su vez incrementan la producción de sus metabolitos.

En el presente trabajo se plantea el uso de liofilizados de postbióticos (metabolitos secundarios) de *L. casei* y *L. plantarum* para evaluar su acción sobre trofozoítos de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas in vitro e in vivo. El carácter innovador del presente trabajo es el diseño de las cápsulas de alginato con capacidad de liberar su contenido exclusivamente a pH de intestino delgado e intestino grueso, estas cápsulas contendrán diversas dosis de postbióticos de *L. casei* o *L. plantarum*

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

- Lactobacillus casei* (ATCC10697)
- Lactobacillus plantarum* (ATCC229)
- Postbiótico de *Lactobacillus casei* y *L. plantarum*.
- Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS)
- Suero bovino estéril
- Ratones Balb/c

- I. Obtención de probióticos y postbióticos de BAL: Se inoculan por separado las cepas de *Lactobacillus*, se incuban por 24 h a 37°C. Se separa el paquete celular del sobrenadante por centrifugación a 2500 rpm/20 min, el sobrenadante recuperado se esterilizará por filtración (Millipore 0.22 µm), se realizará la prueba de esterilidad, enseguida se liofiliza y se almacena a 4°C, el polvo que se obtiene es el postbiótico liofilizado.
- II. Encapsulación: Se preparará soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio en matraces de 500 mL cada uno, enseguida se tomaron 3 mL de los probióticos concentrados de *L. casei* y 3 mL de *L. plantarum*, se disolvieron en el alginato de sodio, con una jeringa se tomará todo el volumen del alginato y el mix se deposita en alícuotas en la solución Ca₂Cl para que se formen las capsulas, todo este proceso se realiza bajo condiciones asépticas.
- III. Encapsulación de fármacos o postbiótico: Se pesa la cantidad deseada del fármaco deseado, se disuelve en el alginato de sodio, con una jeringa se tomará todo el volumen del alginato, y se depositará en alícuotas en la solución de cloruro de campana de flujo laminar
- IV. Cinética de crecimiento de *E. histolytica*: Se realizó de acuerdo con Barrón (2007).
- V. Valoración de la actividad biológica de:
 - a) Postbióticos bajo condiciones axénicas *in vitro*: Se realizaron cultivos de amibas en tubos de ensayo en condiciones controladas, y se expuso a distintas concentraciones de metronidazol, albendazol, nisina (bacteriocina de uso comercial), postbióticos (bacteriocinas) y probióticos, se incuban por 72 h y se realiza el conteo de trofozoítos por mililitro.
 - b) Postbióticos encapsulados bajo condiciones axénicas *in vitro*: Se realiza el mismo procedimiento que el inciso a), pero varía en que los metabolitos empleados son encapsulados.
 - c) Morfometría de trofozoítos: Para el que se determinó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento, se cuantificó la alteración a nivel de membrana empleando el microscopio de fuerza atómica (AFM) para determinar la rugosidad de la membrana, altura, magnitud, longitud, siguiendo la metodología de Menchaca et al. (2014).
 - d) Patrón de proteínas de membrana celular del trofozoíto: Los trofozoítos de *E. histolytica* obtenidos de tratamientos con mayor impacto en la morfología se sometieron a análisis del patrón proteico por la técnica de SDS-PAGE.
 - e) Efecto postbióticos encapsulados sobre amibiasis en un modelo murino. Hasta el momento se han evaluado el efecto de las capsulas de alginato sobre el peso del modelo murino Balb/c. y también se han diseñado cápsulas conteniendo tanto trofozoítos para su implantación a nivel de intestino delgado y también se elaboraron cápsulas con los postbióticos deseados y el fármaco control

RESULTADOS

Cinética de crecimiento de *E. histolytica*: Se observó que durante las primeras 48 h se presentó una ligera fase de adaptación. Posteriormente se observó una fase logarítmica, alcanzando su rendimiento máximo a las 96 h y con un rendimiento de aproximadamente 200,000 cell/mL y después se observó la disminución paulatina en el número de células.

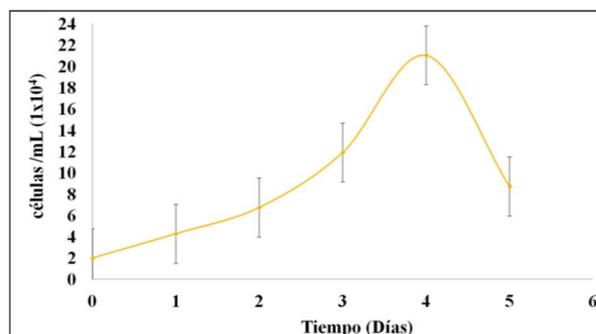


Figura 1. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.

Obtención de postbióticos liofilizados de *L. casei* y *L. plantarum*: El postbiótico liofilizado muestra un aspecto ámbar, y se obtuvo un rendimiento de 20g/L de medio y 14 g/L de medio respectivamente.



Figura 2. Postbiótico liofilizado de *L. casei*.

Valoración de postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum* sobre trofozoítos de *E. histolytica*: Se obtuvo inhibición del rendimiento de trofozoítos principalmente en presencia de la sinergia de los postbióticos de *L. casei* y *L. plantarum*, así como en presencia de Nisina (bacteriocina comercial) la cual empleamos como control. El postbiótico de *L. casei* presenta mayor inhibición a 0.1 mg/mL, en tanto que el postbiótico de *L. plantarum* presenta mayor inhibición a 0.3 mg/mL, sin embargo, la sinergia de ambos postbióticos presentó mayor inhibición a 0.5 mg/mL muy similar a la observada en presencia de nisina a la misma concentración (Figura 3).

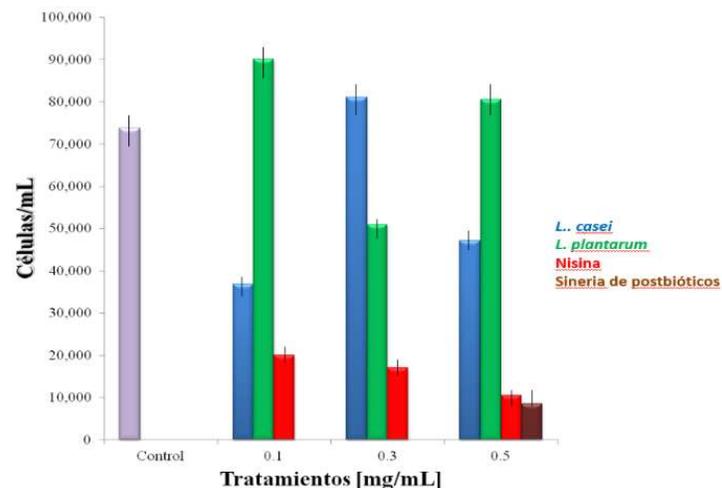


Figura 3. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de postbióticos liofilizados.

Evaluación de la actividad biológica de postbióticos encapsulados de liberación controlada sobre trofozoítos de *E. histolytica*. Se seleccionaron las capsula cuya composición permitiera la liberación de su contenido a pH 7 y 8 (Figura 4).

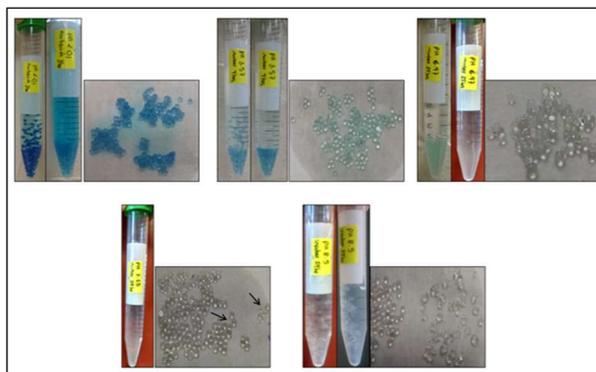


Figura 4. Se observa que el contenido de las capsulas de alginato se liberan completamente a pH 7.25 y 8.5.

Se evaluaron las capsulas de alginato en los cultivos amibianos, para descartar que una posible inhibición amibiana se deba a los componentes de la capsula (Figura 5).

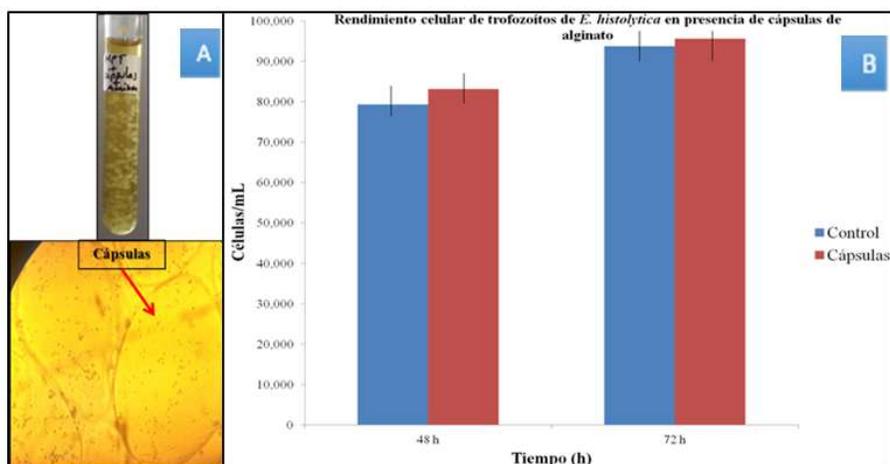


Figura 5. A) Aspecto general de la capsula de alginato en el medio de cultivo de trofozoitos de *E. histolytica*, en B) se observa que los componentes de la capsula no inhibe el crecimiento de los trofozoitos de *E. histolytica*.

Se seleccionó la composición de la capsula que liberó su contenido a pH 7.25 para emplear esta formulación en la encapsulación de fármacos antiamebianos y la nisina y evaluar su actividad sobre los cultivos de trofozoitos de *E. histolytica*.

Evaluación antiamebiana de fármacos encapsulados: Se observa una marcada inhibición del protozooario en presencia de albendazol, metronidazol y nisina encapsulados sobre el crecimiento de trofozoitos de *E. histolytica*, lo cual nos indica que se liberaron adecuadamente las moléculas y ejercieron su actividad antiamebiana (Figura 6).

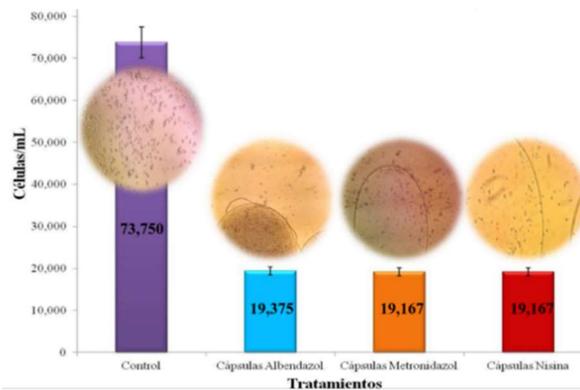


Figura 6. Comparación de la actividad antiamebiana ejercida por los fármacos y la nisina los cuales previamente fueron encapsulados y colocados en el medio de cultivo de trofozoítos de *E. histolytica*.

De acuerdo con los resultados se observa mayor inhibición de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de la sinergia de postbióticos con respecto a la nisina (Figura 7).

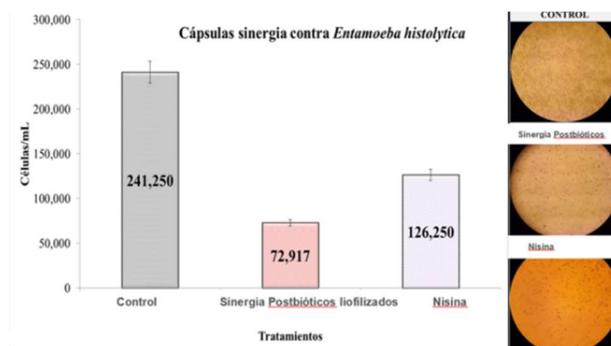


Figura 7. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica*. a) en presencia de cápsulas sinergia de postbióticos y la nisina (bacteriocinas).

En este trabajo, se observó que las cápsulas de sinergia de postbióticos presentaron una inhibición del 70% y la sinergia de bacteriocinas mostraron una actividad antiamebiana del 48%, sin embargo, los demás tratamientos con cápsulas de albendazol, metronidazol y nisina presentaron una inhibición de aproximadamente un 74%. (Figura 8).

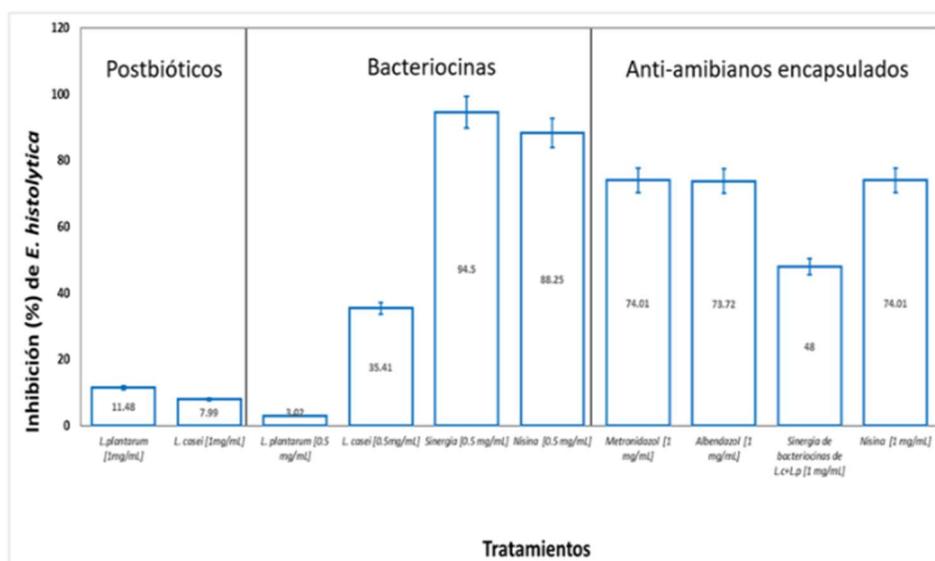


Figura 8. Comparación de la actividad antiamebiana de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de *L. plantarum* y *L. casei*.

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 8 y Tabla 1, se observa que la sinergia de bacteriocinas de *L. plantarum* + *L. casei* presentó la mayor actividad antiamebiana con un 94.5% de inhibición, el encapsulado de sinergia de las bacteriocinas inhibió un 48%, los fármacos antiamebianos (metronidazol y albendazol) encapsulados presentaron un 74 y 73.7% de inhibición respectivamente y la nisina encapsulada también inhibió el crecimiento de *E. histolytica* en un 74.01%, valor semejante al observado con las drogas antiamebianas, no presentando diferencia significativa entre estos tres tratamientos encapsulados, pero sí presentan diferencia significativa con respecto a la sinergia de las bacteriocinas encapsuladas.

Tabla 1. Cuadro comparativo en donde se muestra la actividad antiamebiana de los postbióticos, bacteriocinas y bacteriocinas encapsuladas de *L. plantarum* y *L. casei*.

Condición de Evaluación	Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)
Postbiótico	<i>L. plantarum</i>	1	11.48
	<i>L. casei</i>	1	7.99
Bacteriocinas	<i>L. plantarum</i>	0.5	3.02
	<i>L. casei</i>	0.5	35.41
	Sinergia bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>	0.5	94.5
	Nisina	0.5	88.25
Capsulas	Metronidazol	1	74.01
	Albendazol	1	73.72
	Sinergia de bacteriocinas de <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>	1	48
	Nisina	1	74.01

Es importante observar el incremento en la inhibición de los cultivos de *E. histolytica* de la sinergia de los postbióticos de *L. casei*+ *L. plantarum*, se observa que al ser evaluadas las bacteriocinas de *L. casei* sólo inhibió un 35.41% y las bacteriocinas de *L. plantarum* sólo inhibió un 3.02%, ambas bacteriocinas se evaluaron a 0.5 mg/mL.

Análisis de trofozoítos de *E. histolytica* al MFA y el impacto de las bacteriocinas sobre la membrana celular: Se analizaron trofozoítos a) control y b) cultivados en presencia de la sinergia de

bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* [0.5 mg/mL]. Los parámetros determinados fueron: altura, rugosidad, ancho y longitud (Tabla 2), los resultados que se muestran son el promedio de tres eventos independientes por triplicado.

Tabla 2. Análisis de características morfométricas de trofozoítos de *E. histolytica* cultivado en presencia de la sinergia de bacteriocinas de *L. casei*+*L. plantarum*

Parámetros	Trofozoito (Control)	Trofozoito (Sinergia de bacteriocinas <i>L. casei</i> + <i>L. plantarum</i>)
Rugosidad(nm)	216	461
Altura (µm)	1.83	3.22
Ancho (µm)	56.2	25
Longitud (µm)	69	33

De acuerdo a los valores obtenidos (Tabla 3 y Figura 9) se observó que la célula pierde su forma plana, ya que tiende a incrementar la altura significativamente y es más estrecha significativamente y menos alargada, y la longitud se observa disminuida significativamente, lo cual nos hace pensar que la célula tiende a redondearse o tomar una forma esférica, lo cual se puede corroborar con el aspecto de la célula en la imagen 3D de la Figura 10 a, esta morfología es típica de un cultivo amibiano alterado y no viable.

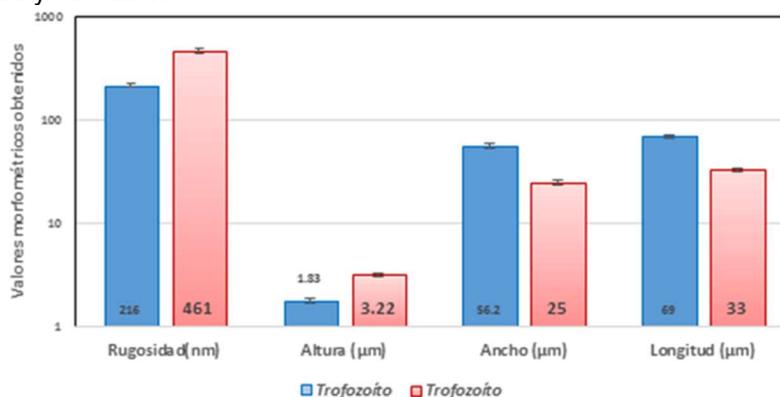


Figura 9. Análisis comparativo del análisis morfométrico de *E. histolytica* cultivado en presencia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum* tomando como referencia los valores morfométricos de un cultivo control.

En la imagen de altura en el trofozoito control se observan zonas claras (corresponde a zonas más altas) la cual alcanza una altura de 3.657 µm el pico o zona más elevada y el trofozoito control presenta la zona más elevada a una altura de 5.912 µm, en la imagen del trofozoito control también se observan zonas oscuras, lo cual representa la zona más profunda, esto no se observa en el trofozoito del tratamiento con bacteriocinas, en cuanto a la magnitud nos indica la composición de la membrana celular, la cual se aprecia relativamente uniforme en los bordes de la periferia del trofozoito control (el cual puede corresponder al periplasma) y en el centro puede corresponder a la zona vacuolar, en cuanto a la magnitud (composición celular) en la imagen del trofozoito testigo se observa un aspecto o magnitud muy diferente al control, lo cual nos indica que la composición de la membrana no es igual en ambos casos; en la imagen en 3D nos permite apreciar en la imagen del trofozoito control el aspecto típico pleomórfico de los trofozoítos, es decir que no tiene una forma específica, además se observan ciertas protuberancias las cuales corresponden a pseudópodos, y en el trofozoito en tratamiento no presenta estos pseudópodos, se observa principalmente con un aspecto esférico (Figura 10a y 10b).

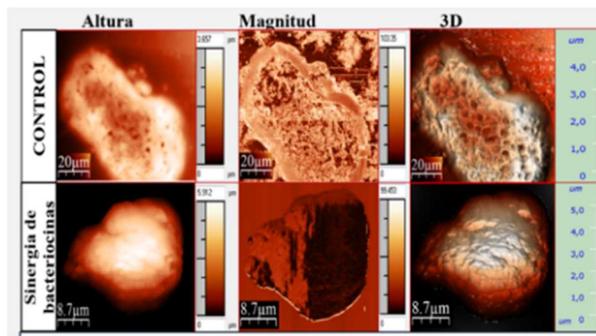


Figura 10a. Análisis comparativo al AFM de trofozoítos de *E. histolytica* control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de *Lactobacillus* sp.

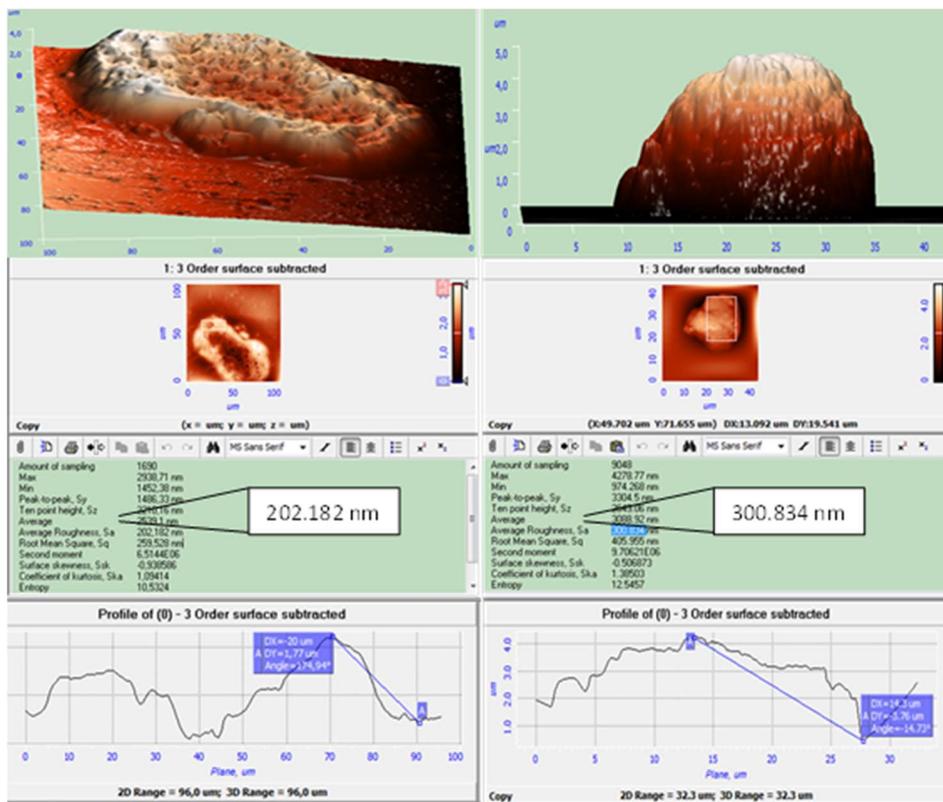


Figura 10b. Análisis comparativo al AFM de trofozoítos de *E. histolytica* control y en presencia de encapsulados de sinergia de bacteriocinas de *Lactobacillus* sp

Análisis proteicos de trofozoítos por SDS-PAGE de componentes de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum*: En la Figura 11, e observa al marcador de proteínas (M) con un rango de peso molecular de 14 a 200 kDaltones (kDa), en A se muestra el patrón de proteínas de trofozoítos control, se observan gran cantidad de bandas de proteínas que presentan un peso molecular entre 30 y 50 kDa, otro grupo de bandas proteicas muy marcadas se observan entre 60 a 140 kDa aproximadamente, se observa el mismo patrón el gel SDS-PAGE de referencia.

En el carril B, se muestran las bandas de proteínas que se obtuvieron de trofozoítos cultivados en presencia de la sinergia de bacteriocinas de *L. casei* + *L. plantarum*, se observa marcada inhibición en el bandeado proteico con respecto al control, los bandeos que se ven muy disminuidos son: de 18, 31, 37-43 y entre 50 a 120 kDa; estas bandas proteicas probablemente correspondan a enzimas

necesarias para diversos procesos metabólicos, pero también pueden corresponder a enzimas líticas tipo cisteína-proteasas (Figura 11).

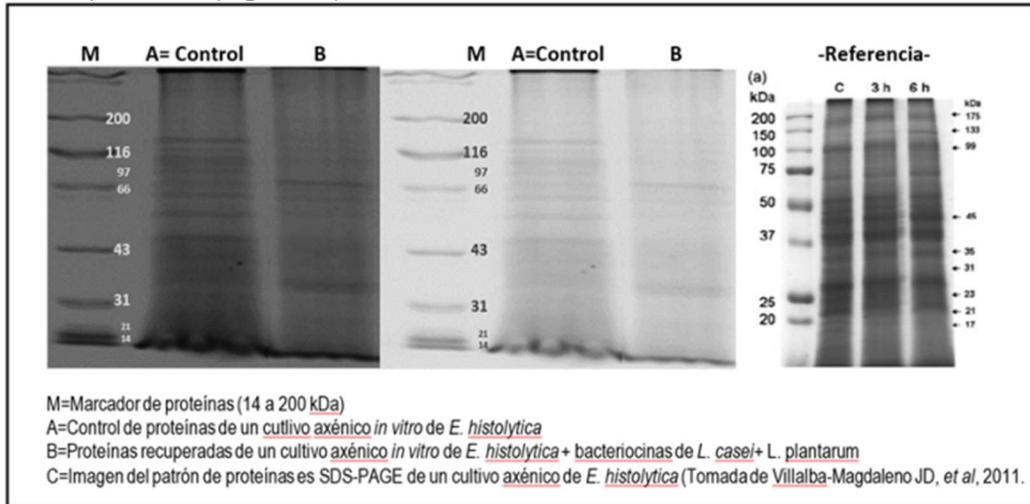


Figura 11. Comparación del patrón electroforético de proteínas totales de *E. histolytica* cultivado en presencia de bacteriocinas de *Lactobacillus sp.*

Actividad biológica de capsulas de alginato y capsulas + *L. casei* en un modelo murino (Balb/c): Se evaluaron sobre los modelos murinos, las capsulas de alginato de sodio+ el alimento comercial(a) y capsulas de alginato de sodio + *L. casei*, los resultados se muestran en la Figura 12.

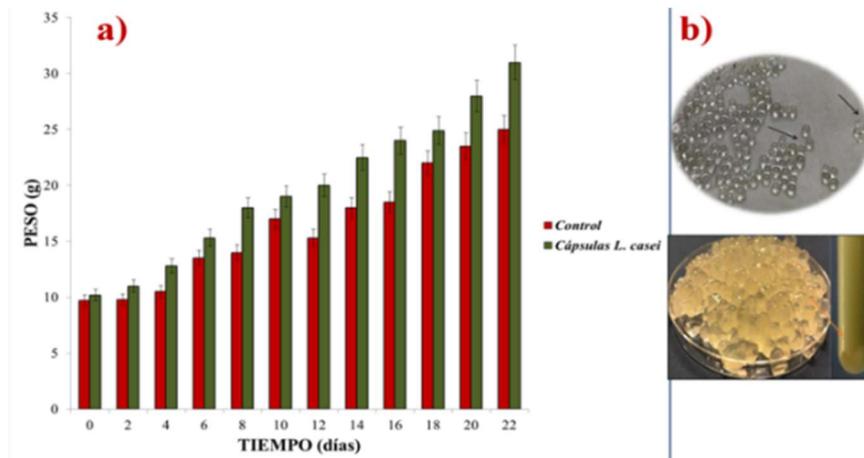


Figura 12. a) Comparación del peso (g) de ratones cepa Balb/c alimentados con alimento comercial y encapsulados de *L. casei*. b) Imágenes de los encapsulados de *L. casei*.

Se observa que al día 22 los murinos alimentados con cápsulas de alginato de sodio + *L. casei* se incrementa su peso en comparación con los murinos que sólo consumieron las capsulas de alginato con el alimento comercial (Figura 13).



Figura 13. Imagen de un murino consumiendo capsulas con bacterias probióticas de *L. casei*.

Enseguida se evaluaron las UFC/mL de bacterias presentes en las heces de los murinos Balb/c alimentados con el alimento comercial (a) y alimentados solo con capsulas conteniendo *L. casei* (Figura 14), observando diferencia significativa con respecto a las UFC/mL presentes en cada tratamiento, lo cual nos indica que las capsulas de alginato son un buen acarreador de metabolitos y células viables.

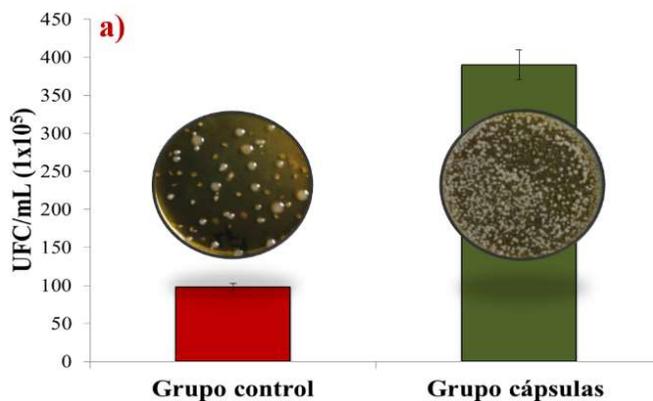


Figura 14. a) Comparación de las UFC/mL (1×10^5) obtenidas en heces fecales al día 22. Sobre las barras se observa el aspecto general de las colonias en placa para la determinación de las UFC/mL.

Actualmente nos encontramos trabajando en el bioensayo *in vivo* para evaluar en un modelo murino Balb/c la actividad biológica de los fármacos antimicrobianos, y los postbióticos encapsulados sobre la amibiasis, se trabaja de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3. Modelo de trabajo en un modelo murino para evaluar la actividad antiamebiana de los postbióticos encapsulados.

Grupo 1 12 individuos	Grupo 2 12 individuos	Grupo 3 12 individuos	Grupo 4 12 individuos
			
Prevención de infección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	Tratamiento para infección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	Tratamiento para infección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	Control
dieta comercial molida + postbióticos encapsulados	dieta comercial molida + postbióticos encapsulados	dieta comercial molida + capsulas con metronidazol	dieta comercial molida

CONCLUSIONES

La sinergia de los postbióticos liofilizados y bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* inhiben el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas in vitro.

Las capsulas diseñadas con alginato de sodio tienen la capacidad de liberar el contenido en la región intestinal deseada.

La microscopía de fuerza atómica es una herramienta eficiente que aporta valiosa información acerca de las alteraciones celulares que son provocadas por las bacteriocinas sobre el trofozoíto de *E. histolytica* HM1-IMSS.

Los encapsulados de *L. casei* añadidos en la dieta de los ratones (*M. musculus* cepa Balb/c) promueven su instalación intestinal del probiótico y estimulan el aumento de peso en los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal, A., Kanekar, S., Sabat, S., & Thamburaj, K. (2016). Metronidazole-Induced Cerebellar Toxicity. *Neurology international*, 8(1), 6365.
2. Aguilar, J. E., Garcia, R., Garcia, H. S., Mata, V., González, A. F., Vallejo, B. & Hernández A. (2018). Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.009.
3. Barrón-González MP, Villareal-Treviño L, Reséndez-Pérez D, Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR. (2008) Entamoeba histolytica: Cyst-like structures in vitro induction. *Experimental Parasitology* 118: 600–603.
4. Cicienia, A., Santangelo, F., Gambardella, L., Pallotta, L., Iebba, V., Scirocco, A. & Severi, C. (2016). Protective role of postbiotic mediators secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG versus lipopolysaccharide-induced damage in human colonic smooth muscle cells. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50(2), S140-S144. doi:10.1097/MCG.0000000000000681
5. Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-67. doi:10.3390/ijerph110504745.
6. González, M; Carabarin, A; Baylon, L and Rosales, J. (2012) De amibas y amebiasis: Entamoeba histolytica. *Elementos* 87:13-18.
7. Hernández, C., Aguilera, M. G. & Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4). 137 – 158.
8. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P.C. y Sanders, M.E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

9. Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*, 2013, 481651.
10. Menchaca J, Barrón M, León A, Ortega J, Vargas J, Hernández J, Morales M. (2014) Entamoeba histolytica: trophozoite, precyst and cyst studied by atomic force microscopy. *Microscopy: advances in scientific research and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) 1:153-160.
11. Pérez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L., & Schiffrin, E.J. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli* : An in vitro Study. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11):5037-5042. doi: 10.1128/AEM.67.11.5037-5042.2001
12. Reyes Esparza, Jorge A., & Rodríguez Fragoso, Lourdes. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hace un gran trabajo? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(1), 7-17.
13. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), Secretaría de Salud. (2019). *Boletín Epidemiológico/Dirección General de Epidemiología*, 4(36):16-19.
14. Tsilingiri, K., & Rescigno, M. (2013). Postbiotics: What else? *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107. doi.org/10.3920/BM2012.0046.
15. Varo B. (2010). Caracterización parcial de bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas aisladas de hortalizas. IPN. México, Distrito Federal. Tesis de Doctorado.

PRODUCTOS DE HIGIENE BUCAL CON UN ENFOQUE SUSTENTABLE

Gabriela López Torres y Berenice Alcalá Mota Velásco

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
gabylopt@hotmail.com

RESUMEN

La utilización cada vez mayor de plásticos de un solo uso, así como de sustancias de alto impacto hacia el medio ambiente, en la fabricación de los productos de higiene bucal, motiva a buscar alternativas que permitan mantener los estándares de salud bucodental y al mismo tiempo tengan una disminución en la huella ecológica. El presente trabajo muestra los resultados de un estudio en donde se presentan diversas opciones para la elaboración de productos de higiene bucodental, tales como dentífricos, enjuagues bucales, blanqueadores dentales, hilos dentales y cepillos dentales, los cuales han sido fabricados sin el uso de sustancias químicas de alto impacto hacia el medio ambiente y sin el uso de plásticos como medios de envase. En este trabajo se presentan algunos análisis que muestran el impacto que tiene el uso de las tecnologías propuestas hacia el medio ambiente, la economía familiar y la salud del ser humano.

En este estudio participaron pacientes que acuden al servicio dental que ofrece la Facultad de Odontología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La muestra con la que se trabajó fue de 30 pacientes que aceptaron participar en el proyecto de investigación, a los cuales se les realizó una valoración previa del estado de salud gingival. Adicionalmente, se les indicó sobre la técnica para la elaboración de diversos productos de higiene bucodental, mismos que se emplearon durante un periodo de un mes. Al término de este tiempo se les realizó nuevamente una valoración del estado de salud gingival.

Los resultados del estudio mostraron que no existe evidencia en cuanto a una diferencia sobre el uso de productos de higiene bucodental comerciales y los de preparación doméstica. Además se observó una disminución en los gastos familiares asociados a los productos de higiene bucodental. Por otro lado se redujo de manera considerable el uso de envases plásticos así como de productos químicos asociados a la fabricación de los productos comerciales de higiene bucodental.

Los resultados de esta investigación muestran que las familias pueden aplicar tecnologías simples en la higiene bucodental cotidiana, que por un lado implican una disminución en el gasto familiar y por otro benefician de manera importante al medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

La sustentabilidad ambiental está relacionada con cada aspecto de la vida, que involucra construcciones ecológicas hasta el abastecimiento de alimentos sustentables, energía renovable, muebles y ropa de bajo impacto ecológico.

La utilización cada vez mayor de plásticos de un solo uso, así como de sustancias de alto impacto hacia el medio ambiente, en la fabricación de los productos de higiene bucal, tales como dentífricos, enjuagues bucales, cepillos dentales, hilo dental, blanqueadores dentales, etc., motiva a buscar alternativas que permitan mantener los estándares de salud bucodental y al mismo tiempo tengan una disminución en la huella ecológica. El presente trabajo muestra los resultados de un estudio en donde se presentan diversas opciones para la elaboración de productos de higiene bucodental, tales como dentífricos, enjuagues bucales, blanqueadores dentales, hilos dentales y cepillos dentales, los cuales han sido fabricados sin el uso de sustancias químicas de alto impacto hacia el medio ambiente y sin el uso de plásticos como medios de envase. En este trabajo se presentan algunos análisis que muestran el impacto que tiene el uso de las tecnologías propuestas hacia el medio ambiente, la economía familiar y la salud del ser humano.

En este estudio participaron pacientes que acuden al servicio dental que ofrece la Facultad de Odontología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

TEORÍA

La odontología implica un ejercicio de manera ética, con absoluta calidad y seguridad tanto para el paciente como para el odontólogo. La sustentabilidad involucra un compromiso de responsabilidad del odontólogo con la sociedad y el ambiente (FDI General Assembly August, 2017).

Es urgente identificar las oportunidades que se tienen en el desarrollo de la práctica odontológica sustentable en México, analizar los conceptos generales a cerca de la sustentabilidad, considerar los beneficios de la práctica odontológica sustentable y de esta determinar estrategias para la implementación de una práctica odontológica sustentable en el país, con un impacto mínimo en el medio ambiente.

El odontólogo debe reforzar que la seguridad del paciente y la calidad de la atención prestada siempre son la principal preocupación; al mismo tiempo es importante reducir el consumo de energía, agua, papel y cualquier material que podría ser perjudicial para el medio ambiente, así como las emisiones al aire y al agua. Los odontólogos deben considerar el entorno de forma congruente, en conjunto con los órganos reguladores y políticas de salud del gobierno.

Por otro lado, es importante orientar a los pacientes odontológicos sobre hábitos higiénicos bucales sustentables, en virtud de que la generación de desechos a partir de microplásticos contribuye del 15% al 31% de la contaminación total de plásticos arrojados a los océanos, que alcanzan los 9.5 millones de toneladas de plástico cada año.

Un estudio de Geyer en 2017, publicó que el 90.5% de los plásticos fabricados en el mundo no se reciclan. Este mismo estudio asegura que de seguir este ritmo, en el 2050 habría 12 millones de toneladas métricas de plástico en los vertederos, siendo 35,000 veces más pesada que el Empire State.

La ONU, en el 2016, informó de la presencia de microplásticos hasta en 800 especies de peces, crustáceos y moluscos. Esto en virtud de que los plásticos van siendo degradados por el sol, el agua del mar y se convierten en partículas pequeñas que los animales marinos confunden con alimento. Los envases plásticos de las pastas dentales comerciales contribuyen en esta práctica. Por un lado, el envase por sí mismo, contamina el medio ambiente. Por el otro, los componentes de las pastas comerciales son nocivos de igual manera.

La mayoría de pastas dentales comerciales contienen:

Triclosán

Es frecuentemente usado en las pastas convencionales. Se conoce su actividad antibacteriana, en la placa y la gingivitis. Sin embargo se conoce también su capacidad para producir resistencia a antibióticos, así como distintos trastornos a nivel endócrino, que puede provocar cáncer de mama, testículos y ovarios.

La cadena se inicia cuando este compuesto llega al agua. El crecimiento de las algas verdes y las cianobacterias puede ser inhibido ante la exposición del triclosán. (Orvos y col., 2004). En el mismo estudio, se demostró que las crías de la trucha arco-iris presentaban una disminución de su supervivencia en exposiciones de 1 a 2 meses a niveles de TCS de 71,3 ng/mL y para las truchas perca (*Leponis macrochirus*), a los 260-440 ng/mL. Fraker y col., 2004, demostraron que en el caso de la rana leopardo (*Rana pipiens*), a concentraciones de 230 ng/mL se provocan alteraciones del sistema nervioso.

Lauril Sulfato De Sodio (SLS)

Frecuentemente está presente en las pastas de dientes, jabones de baño y shampoo. En la pasta dental se utiliza como espumante, además de disolver la capa de grasa. Sin embargo, se ha demostrado que puede predisponer a irritación de la piel y cáncer.

También se utiliza como insecticida, para evitar la propagación del dengue, por lo que si se encuentra en la pasta dental es tóxico en las especies marinas cuando se vierte a los mares.

Sacarina y Aspartamo

Son edulcorantes artificiales. La sacarina es también un edulcorante artificial, derivado del petróleo. Prohibida en países como Francia y Canadá. Existen estudios probados que demuestran un mayor riesgo de padecer cáncer de vejiga si se consume. El aspartamo es utilizado como un edulcorante

artificial, está constituido por ácido aspártico y fenilalanina. Cuando se descompone se produce metanol. Puede ocasionar dolor de cabeza, mareos, náuseas, alteraciones gastrointestinales y cáncer.

Flúor

Actualmente se ha puesto en duda su capacidad anticaries ya que puede provocar fluorosis dental. Por otra parte, su acumulación en tejidos puede provocar daños neurológicos y trastornos endocrinos.

Dietanolamina (DEA)

Se utiliza por su efecto como espumante, pero puede interferir en el funcionamiento hormonal y provocar cáncer.

Propilenglicol de Origen Mineral

Este aceite mineral se utiliza como anticongelante en la industria. En las pastas de dientes se utiliza como tensioactivo. Es irritante para la piel, ojos y pulmones.

Microesferas de Plástico

Estas se utilizan como abrasivos en productos de cosmetología y pastas dentales como abrasivos. Favorecen la eliminación de la placa dental, pero al mismo tiempo pueden desgastar el esmalte o incrustarse en las encías causando enfermedades en las mismas. Una vez en el mar, llegan al cuerpo de las especies marinas, que seguramente volverán a ser ingeridos por los seres humanos. Afortunadamente, existen opciones que pueden ser utilizadas como pasta dental, cuyos componentes, distantes de ser dañinos a los seres vivos, pueden traer beneficios a la salud sin tener un impacto al medio ambiente.

Manzanilla

Desde la antigüedad, se conocen las propiedades curativas de la manzanilla (*chamomilla*), por lo está incluida dentro de las plantas medicinales. Entre sus componentes más importantes están el azuleno (antiinflamatorio), el alfa bisabodol (antiinfeccioso y antiséptico) (Haarmann y Reimer, 1990; Fleischer, 1985) y la vitamina C (antiinfecciosa y cicatrizante). (Katz y cols, 1982). Tubaro y cols., en 1983, demostraron la acción *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans*, *pseudomona*, *Klebsiella* y *Candida* del extracto de flor de manzanilla.

Aceite de coco

Es conocido por su acción bactericida, antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria, hipoglucemiante, hepatoprotector y estimulante el sistema inmunológico por su alto contenido de ácidos grasos. Tanto en la medicina complementaria como la alternativa realizan enjuagues con aceite de coco en la boca para atraer toxinas de la sangre a través de las membranas mucosas permitiendo al sistema inmunológico reducir el estrés. Desde hace más de 2000 años, los practicantes ayurvédicos se lavaban la boca con aceite vegetal para restablecer la salud del cuerpo (Santana, 2016).

Bicarbonato de sodio

El bicarbonato de sodio es una sustancia alcalina que neutraliza los ácidos en la boca, elimina los gérmenes reflejándose en la reducción del mal aliento. El bicarbonato en boca, mantiene un pH de 8.1, de tal manera que si se encuentra a menos 8, lo aumenta (Healing teeth naturally 2009-2015). Según expertos, el Índice de Abrasividad Dentina va de 0 a 250. Para que un abrasivo dental se considere seguro, debe tener un índice de máximo 100. El bicarbonato de sodio tiene un índice de 7, que lo hace muy seguro.

Esencia de menta

Los aceites esenciales comestibles son opcionales y son una alternativa para disimular el sabor de las pastas dentales caseras.

METODOLOGÍA

La muestra con la que se trabajó fue de 30 pacientes que aceptaron participar en el proyecto de investigación. Estos pacientes fueron seleccionados de tal forma que 15 de ellos presentarían una salud gingival (grupo control), mientras que los otros 15 participantes tendrían un grado ligero de gingivitis (grupo experimental). A los 30 participantes se les realizó una valoración del estado de salud gingival, considerando cuatro variables:

- Color de la encía
- Grosor de la encía
- Sangrado de la encía
- Punteado superficial

En el grupo control, se incluyeron aquellos individuos (15) que presentarían las características de la encía sana: color rosa pálido, sin sangrado, grosor delgado y punteado superficial o piel de naranja. De los participantes en el grupo experimental (15), se identificaron las características mostradas en la Tabla 1:

Tabla 1. Características de salud gingival del grupo de control.

	Características							
	Sangrado		Color		Grosor		Punteado superficial	
	Si	No	Enrojecido	Rosa pálido	Grueso	Delgado	Sin punteado	Punteado
Individuos	10	5	11	4	12	3	11	4
Porcentaje	66.67	33.33	73.33	26.67	80.00	20.00	73.33	26.67

Los datos recabados fueron anotados en una hoja de registro, para realizar el control previo y posterior a la intervención.

El rango de las edades de los participantes, tanto del grupo de control como del grupo experimental se encontraba entre los 18 a 25 años, siendo uno de los criterios de inclusión. Una vez que se les explicó detalladamente lo que implicaba el estudio, procedieron a firmar el consentimiento informado. Se les aplicó una encuesta para conocer sus hábitos de higiene bucal, así como identificar el gasto mensual en dentífricos. Posteriormente, se hizo entrega a cada uno de los participantes de las indicaciones para la elaboración de la pasta dental casera, que incluía entre sus componentes: aceite de coco, bicarbonato de sodio, aceite de manzanilla y esencia de menta. Se les pidió que durante un periodo de 30 días utilizaran dicha pasta en su cepillado dental diario (3 veces al día). Finalizado el periodo de 30 días, se realizó una segunda valoración para determinar el efecto del uso de la pasta dental casera.

RESULTADOS

Los resultados del estudio mostraron que no existe evidencia respecto a una diferencia sobre el uso de productos de higiene bucodental comerciales y los de preparación doméstica en pacientes sanos. Sin embargo, en pacientes con signos leves de gingivitis, mostraron una mejoría. Además se observó una disminución en los gastos familiares asociados a los productos de higiene bucodental. Por otro

lado se redujo de manera considerable el uso de envases plásticos así como de productos químicos asociados a la fabricación de los productos comerciales de higiene bucodental.

En cuanto a las características de la encía evaluadas previo y posterior al uso de la pasta dental casera, se muestran los resultados en las gráficas mostradas en la Figuras 1, 2, 3 y 4.

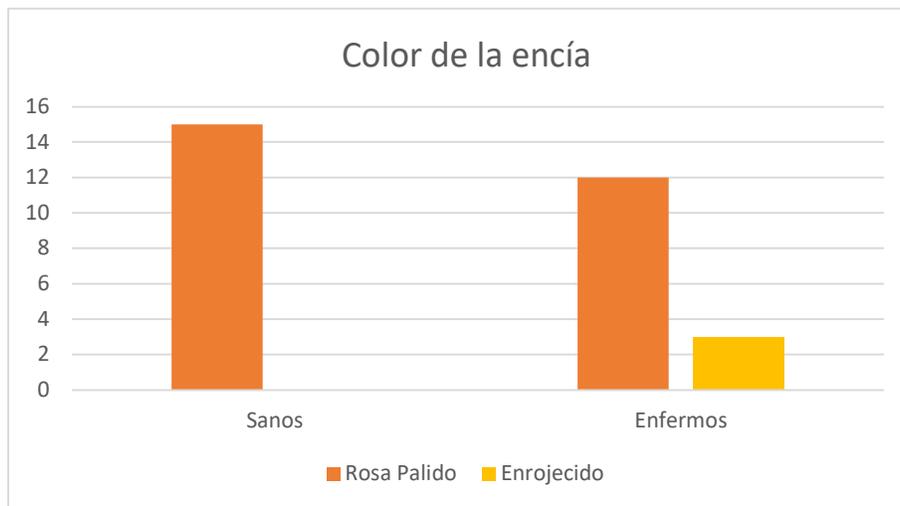


Figura 1. Comparación del color de la encía del grupo control y del grupo experimental después de la intervención.

Color de la Encía:

En el grupo control, el total de individuos mantuvo el color sano de su encía después de la intervención. En el grupo experimental, 12 individuos, es decir el 80%, mejoraron el color de la encía, presentando recuperación del enrojecimiento inicial, tal y como se observa en la gráfica mostrada en la Figura 1.

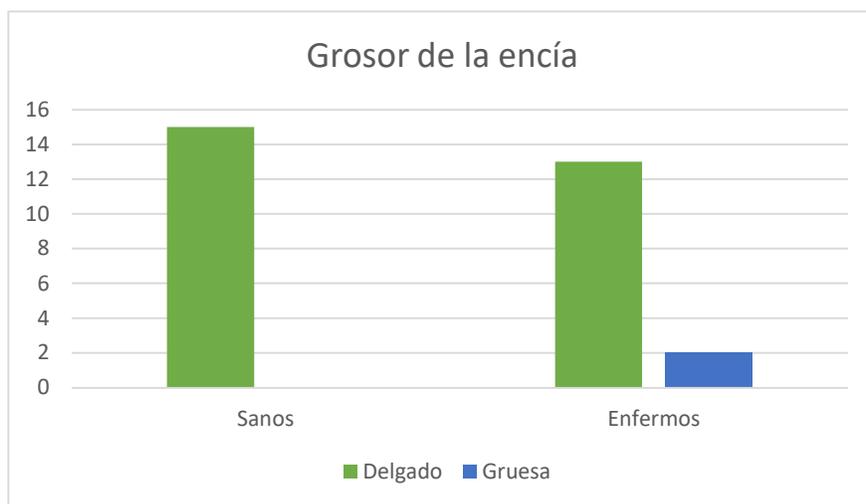


Figura 2. Comparación del grosor de la encía del grupo control y del grupo experimental después de la intervención.

Grosor de la encía:

En el grupo control, después de la intervención, el total de los individuos conservó el grosor normal de la encía (delgada). En el grupo experimental, 13 individuos, el 86.66 %, mejoraron el grosor de la encía (inflamación inicial), presentando un grosor más delgado al final de la intervención, tal y como se puede apreciar en la gráfica presentada en la Figura 2.

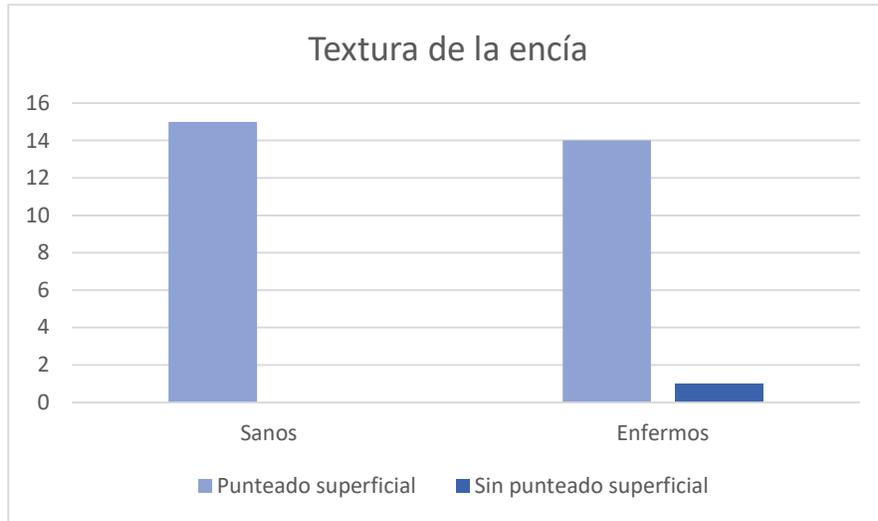


Figura 3. Comparación de la textura de la encía del grupo control y del grupo experimental después de la intervención.

Textura de la encía:

Del grupo control, los 15 individuos conservaron la textura normal después de la intervención (punteado). Del grupo experimental, 14 de los 15 individuos (el 93.33 %) mejoraron la textura de la superficie de la encía presentando un punteo normal, lo cual puede ser apreciado en la gráfica presentada en la Figura 3.

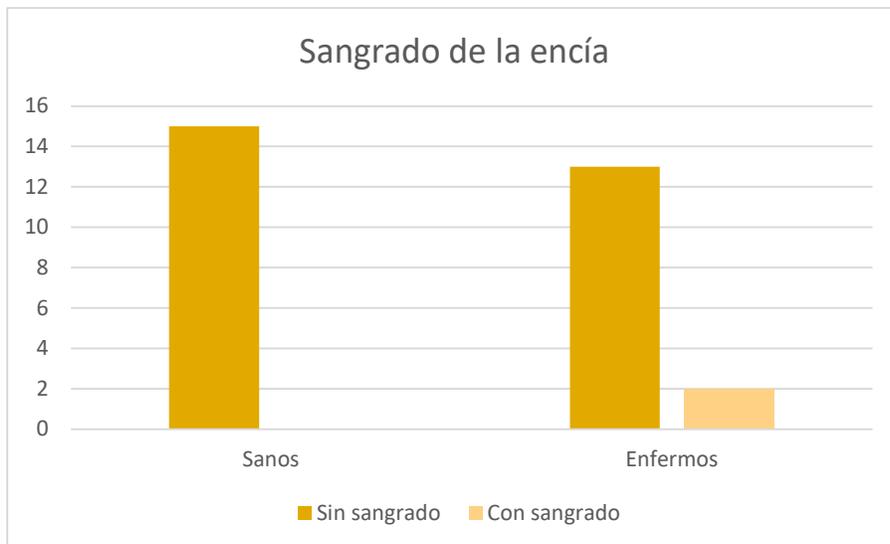


Figura 4. Comparación del sangrado de la encía del grupo control y del grupo experimental después de la intervención.

Sangrado de la encía:

Del grupo control, la totalidad se mantuvo sin sangrado. Del grupo experimental, 13 presentaron una mejoría respecto del sangrado gingival inicial, esto es mostrado en la gráfica de la Figura 4.

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación muestran que las familias pueden aplicar tecnologías simples y de bajo costo en la higiene oral cotidiana, para de esta forma mantener y/o mejorar la salud bucodental y, que además impactan de manera positiva al medio ambiente. En este trabajo se rescatan las bondades del uso de plantas medicinales, así como otros recursos naturales que no tienen efectos negativos a la salud. Se muestra que en promedio se consiguió una mejoría mayor al 85 % en la salud bucodental en el grupo de experimental. Adicionalmente, se mantuvo la salud bucodental del grupo control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haarmann y Reimer. Cremogen chamomile. Mev. Espec. New. RFA, 1990.
2. Fleischer AM. Plants extracts to accelerate healing and reduce inflammation. *Cosmet Toiletttes* 1985;100: 45.
3. Katz S, Mc Donald SL, Stookey GK. Odontología preventiva en acción. 3 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1982:272-3.
4. Tubaro Aurelia, Della Loggia Roberto, Banfi Elena, Cinco Marina, Redaelli Claudio. Therapeutic compositions having antibacteric activity comprising a fraction extracted from camomile flowers and process for the preparation of said fraction. United States, United States Patent US19830499894. 31 May 1983.
5. Roland Geyer, Jenna R. Jambeck, Kara Lavender Law. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. US, Jul 2017: E1700782
6. Gispert Abreu, Estela, Cantillo Estrada, . Elena, Rivero López, . Aracelys, & Oramas Rodríguez, Berta. (1998). Crema dental con manzanilla, efecto estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 35(3), 107-111
7. Orvos, D., Versteeg, D., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V 2004. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 1338- 1349.
8. Fraker, S., Smith, G. 2004. Direct and Interactive Effects of Ecologically Relevant Concentrations of Organic Wastewater Contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles. *Environmental Toxicology*. 3: 250-256.
9. Santana, Alan www.saludcasera.com/salud-bucal/enjuague-con-aceite-vegetal/enjuagueaceite-coco-oil-pulling/
10. Healing teeth naturally. 2009-2015. Baking soda helps teeth and gums. Recuperado de: <http://www.healingteethnaturally.com/baking-soda-sodium-bicarbonate.html>
11. FDI General Assembly: August 2017. Madrid, Spain. *International Dental Journal* 2018; 68: 10–11

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE CEPAS COMERCIALES DEL GÉNERO *PLEUROTUS* Y SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Erick Daniel Álvarez Ramírez¹, Angélica Cruz Solorio¹, Gustavo Valencia del Toro¹, María Eugenia Garín Aguilar² y Leticia Aguilar Doroteo¹
letyad05@hotmail.com

¹Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, UPIBI, Instituto Politécnico Nacional, Barrio La Laguna SN, México D. F.

²Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. De los barrios # 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP 54090. Estado de México, México.

RESUMEN

Los hongos del género *Pleurotus* tienen importancia comercial y ocupan el tercer lugar a nivel mundial en la producción de hongos comestibles. Estos hongos poseen la ventaja de ser cultivados en diferentes materiales lignocelulósicos para su crecimiento (Gregori et al., 2007). El principal parámetro para evaluar el rendimiento de los hongos del género *Pleurotus* es la eficiencia biológica, la cual depende del tipo de cepa y sustrato empleado durante el cultivo (Melo de Carvahlo et al., 2010). Debido a que muchas cepas comerciales utilizadas en México no han sido identificadas a nivel de especie, este trabajo consideró importante su identificación taxonómica molecular y la evaluación de su productividad. La identificación molecular se llevó a cabo con la extracción del ADN genómico de tres cepas de *Pleurotus*, siguiendo el protocolo de extracción de Dellaporta et al., 1983. Se amplificaron los fragmentos y para evidenciar la presencia de material genético se corrieron las muestras extraídas en geles de agarosa, el material genético obtenido fue secuenciado. Para evaluar la productividad se generó el inóculo-grano en trigo estéril de las tres cepas *Pleurotus*: denominadas CC062, CC063 y CC068, posteriormente su cultivo se llevó a cabo en sustrato paja de trigo estéril, cosechando los carpóforos y determinando la eficiencia biológica (EB) y la coloración de los carpóforos con la ayuda de un colorímetro CR-10. De acuerdo a la identificación molecular, las tres cepas comerciales evaluadas corresponden a la especie *Pleurotus ostreatus*. Con respecto a los valores de los parámetros de productividad de las 3 cepas empleadas, los porcentajes de EB obtenidos por la cepa CC063 fue de 87.14%, seguido de la cepa CC062 cuya EB fue de 85.36 % y por último la cepa CC068 con un 71.90%. Presentando un rendimiento en un intervalo de 15.98 a 19.37 % ambos parámetros en la primera cosecha. Los valores de eficiencia biológica son mayores a lo reportado por Ahmed et al., (2013) y Pavlik & Pavlik (2013), al trabajar con *P. ostreatus* y *P. ostreatus* var *columbinus*, respectivamente. En relación a la coloración de los basidiomas, de acuerdo con el código Munsell la cepa CC068 presentó carpóforos color gris claro, mientras que los carpóforos de la cepa CC063 y CC062 colores marrón claros. La utilización de métodos de biología molecular permitió la identificación de las cepas comerciales y los parámetros de productividad nos asintieron seleccionar la cepa CC063 como la que obtuvo mayor EB.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción mundial de hongos comestibles supera los 7 millones de toneladas de hongos frescos por año, cuyo valor económico aproximado es de más de 30 billones de dólares, teniendo una creciente demanda en países de Europa, Norteamérica y Japón (Martínez et al., 2007). Entre los hongos de pudrición blanca se encuentran especies comestibles que se cultivan a escala comercial. En particular, la producción de *Pleurotus ostreatus* conocida con el nombre de "gírgola" u hongo ostra el cual es uno de los hongos cultivados a nivel mundial (Rodríguez et al., 2018). Desde la década de los noventa, se empezó a producir *Pleurotus ostreatus* a nivel de laboratorio, logrando ser la tercera especie más cultivada en el mundo debido principalmente a su facilidad para desarrollarse sobre diferentes tipos de sustratos; no requerir de condiciones ambientales muy exigentes para su producción; y contener excelentes propiedades nutraceuticas (Mendoza et al., 2019). Sin embargo, el género *Pleurotus* tiene variaciones morfológicas complicadas lo que resulta confuso al momento de querer identificar la especie (Venturella 2000). Estudios moleculares

recientes han demostrado que la región ITS del ADN genómico es útil para evaluar las relaciones filogenéticas. Por lo que el objetivo del estudio fue evaluar la producción de tres cepas comerciales cultivado sobre paja de cebada para determinar los parámetros de productividad) y determinar mediante estudio molecular la especie de cada una de las cepas de estudio empleando la región ITS.

METODOLOGÍA

Material biológico: Las cepas de *Pleurotus* empleadas en este estudio son cepas comerciales las cuales fueron denominadas CC062, CC063 y CC068. Las cepas se encuentran depositados en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional en México. El medio de cultivo utilizado para mantener las cepas fue extracto de malta con agar (EMA).

Velocidad de crecimiento micelial: Para evaluar el crecimiento micelial de las cepas se sembraron discos de micelio de 0.8 mm de diámetro en cajas Petri (90 mm de diámetro) con medio EMA a una temperatura de 28°C. Posteriormente se midió el diámetro del micelio cada 24 horas con un vernier hasta que el micelio cubrió la caja completamente. Con los datos se construyeron las curvas de crecimiento para cada una de las cepas. Se graficaron los milímetros obtenidos de cada área de crecimiento micelial en función del tiempo. Las curvas de crecimiento micelial se ajustaron a un modelo lineal ($y = mx + b$) donde “y” es el área de crecimiento (mm), “x” es el tiempo de crecimiento (días) y “m” es la velocidad del crecimiento micelial expresada en mm/día.

Obtención de Inóculo-grano a partir de micelio en medio sólido: La producción del inóculo-grano (“semilla”) se realizó utilizando granos de trigo previamente lavados y remojados a temperatura ambiente durante 24 h; posteriormente, se drenó el exceso de agua y se colocaron 100 g de trigo en bolsas de polipapel (20 x30 cm) las cuales se esterilizaron a 121 °C y 15 lb de presión durante 45 min. Una vez que el grano fue esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, se inoculó con trozos de micelio crecido de cada una de las cepas en medio EMA. Las bolsas inoculadas se incubaron en una cámara oscura a 28 °C hasta que el micelio invadió totalmente el grano.

Inoculación del sustrato: Se empleó paja de cebada hidratada por 24 horas y sometida a pasteurización durante 3 horas, se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez fría se mezcló 150 g de inóculo grano (semilla) con 1 Kg de paja pasteurizada en bolsas de polipropileno, se realizaron 5 réplicas por tratamiento. Las bolsas inoculadas se llevaron a incubación entre 28-30°C a oscuridad, durante 15 días para la colonización del sustrato. Concluido este periodo y con la aparición de los primeros primordios, las bolsas se transfirieron al área de fructificación para el desarrollo de los carpóforos.

Parámetros de productividad: Los parámetros de productividad evaluados se realizaron en términos de eficiencia biológica (EB%), es decir, peso fresco de hongos cosechados entre peso seco del sustrato, tasa de producción (TP%) o promedio diario de EB%, rendimiento (R%) o cociente entre peso fresco de hongos cosechados entre peso húmedo del sustrato, expresados en porcentaje, en cambio el peso promedio de cuerpos fructíferos cosechados (PMCF) como la relación del peso total de hongos frescos cosechados entre el número total de hongos.

Determinación de coloración de los basidiomas: Por último, se tomaron datos de coloración de las carpóforos con el colorímetro triestímulo CR-10 de Konica Minolta. La determinación del color se realizó con los parámetros de color $L^* a^* b$, posterior a ello, se utilizó el código hexadecimal y el código Munsell, lo que permitió identificar con precisión los colores del carpóforo.

Análisis Molecular

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN genómico se utilizó la metodología de Dellaporta (1983). La calidad de ADN se observó mediante electroforesis preparando el gel de agarosa al 1% disuelto en TBE, se utilizó una cámara de electroforesis horizontal, se cargó en cada uno de los

pozos, 5 μ L de ADN de cada muestra, 2 μ L de buffer de corrimiento (6X), 2 μ L de revelador (Gel Red 1000 X) también fue colocado el marcador molecular Lamda Hind III® (Sigma) y el marcador 1 Kb Ladder® (Invitrogen). Posteriormente se corrieron las muestras con la ayuda de una fuente de poder a voltaje de 60 V por 90 min. Una vez que se corrió el gel, este se observó sobre un trasiluminador de luz UV para poder visualizar las bandas correspondientes. El gel se fotografió y se documentó utilizando ENDURO™ GDS Gel Documentation System La concentración y pureza del ADN se determinó a través de Espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific™)

Amplificación y secuenciación: La región ITS de las cepas fue amplificada utilizando los iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Huerta *et al.* 2010) sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La mezcla de reacción de PCR incluyó: 10 ng de ADN de cada muestra, 10 μ M de primer ITS1, 10 μ M de primer ITS4, 23 μ L de PCR SuperMix® (Invitrogen) para llevar a un volumen final de 25 μ L. La amplificación fue realizada en el equipo Sure Cyclyer 88000 Thermal Cyclyer® (Agilent Technologies USA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 5 min, posteriormente por 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento o elongación a 51 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min), finalmente extensión a 72 °C por 10 min. La presencia de los productos de PCR fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Los productos de PCR se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Identificación de la especie: Para evaluar la región ITS total, las secuencias fueron alineadas y analizadas por el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y Mega 6.6, determinando la secuencia consenso, mediante la alineación de dos repeticiones por cepa en ambas direcciones, dichas secuencias fueron comparadas en la base de datos del GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information), a fin de determinar a qué especie del género *Pleurotus* pertenece cada una de las cepas.

Análisis estadístico: Con los resultados obtenidos se aplicó el análisis de varianza ANOVA y las diferencias significativas con el método de comparación múltiple de Duncan.

RESULTADOS

Crecimiento micelial: Se estimó la velocidad de crecimiento en caja de Petri con medio EMA de las cepas comerciales de *Pleurotus*, realizando mediciones diarias del diámetro micelial. En la Figura 1 y Cuadro 1 se presenta el crecimiento y la velocidad de crecimiento de las cepas comerciales evaluadas. El análisis estadístico indicó que las cepas CC062 y CC063 fueron las que presentaron el mayor crecimiento micelial (ANOVA de medidas repetidas y post hoc Duncan (P<0.05)). Huerta *et al.* 2009 encontró valores de velocidad de crecimiento micelial de 9.6 mm/día para *P. ostreatus*, mientras que para *P. djamor* valores de 1.4 a 12.6 mm/día de velocidad de crecimiento. Los valores encontrados en este estudio son similares a los reportados en la bibliografía.

Cuadro 1. Cepa y coloración de carpóforos obtenidos

Cepa	Velocidad de crecimiento (mm/día)
CC062	8,89±0,31 ^a
CC063	8,88 ± 0,10 ^a
CC068	8,04± 0,50 ^b

* Las letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba Duncan P=0.05, n=5

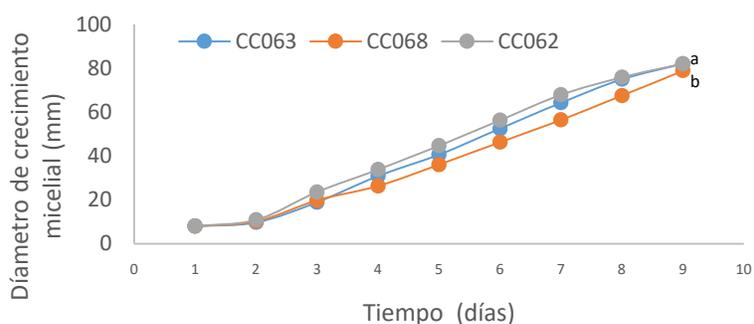


Figura 1. Crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus* crecidas en EMA. * Las letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba Duncan $P=0.05$, $n=5$.

Características morfológicas y productividad de cepas de *Pleurotus* spp.

Coloración de carpóforos

Los carpóforos de la cepa CC062 presentaron coloración gris claro. Con respecto a los carpóforos de la cepa CC063 y la cepa CC068 ambos presentaron una coloración de carpóforos marrón muy pálido. En el cuadro 2 se describe el tipo de cepa y el código Munsell arrojados.

Cuadro 2. Cepa y coloración de carpóforos obtenidos

Cepa	Tipo de cepa	Carpóforo	
		Color	Código Munsell
CC062	Parental	Marrón muy pálido	10YR 7/4
CC063	Parental	Marrón muy pálido	10YR 8/4
CC068	Parental	Gris claro	2.5Y 7/2

Eficiencia biológica, Tasa de producción y Rendimiento.

Se determinaron los parámetros de productividad de cada una de las cepas evaluadas. El sustrato empleado fue paja de cebada, se observó una buena colonización y producción de cuerpos fructíferos. En lo que respecta a la eficiencia biológica, como se muestra en el cuadro 3, la mayor eficiencia biológica la presentó la cepa CC063 con un 86.95 %. Las menores eficiencias se observaron en las cepas CC062 y CC068 mostraron una eficiencia de 85.16% y 71.75 % respectivamente. Salmones et al. (1997) reportaron EB de 75.6 al 68 % en 19 cepas de *Pleurotus* spp., en sustrato de paja de cebada, valores inferiores a los de esta investigación. Acerca del rendimiento obtenido al utilizar la cepa *Pleurotus ostreatus* crecida en el bagazo de caña represento el valor más alto con un 0,90% este resultado difiere con los obtenidos en el presente estudio (Díaz et al., 2019) ya que los valores obtenidos en este estudio oscilaron en 15.98 a 18.97%. En cuanto a la tasa de producción los valores obtenidos fueron en un intervalo de 3.3 a 3.88 % mientras que Romero et al., 2018 reporta valores inferiores que van de 0.29 a 1.06 % usando diferentes testigos y de 0.52 a 1.48 usando suplementación con alfalfa deshidratada.

Cuadro 3.- Eficiencia biológica, Tasa de producción y Rendimiento determinadas a las cepas de *Pleurotus*.

CEPA	TIPO DE CEPA	EB (%)	TP (%)	R (%)	PMCF
CC062	Parental	85.36 ±27.18 ^a	3.88±2.74 ^a	18.97± 6.04 ^a	5.81
CC063	Parental	87.14±10.4 ^a	3.66±1.10 ^a	19.37±2.31 ^a	8.41
CC068	Parental	71.90±23.82 ^a	3.3±2.20 ^a	15.98±5.30 ^a	5.51

* Las letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba Duncan P=0.05, n=5

Análisis Molecular

La amplificación de la región ITS del DNA de las 3 cepas con los oligonucleótidos ITS1 e ITS2 dio como resultado un fragmento único de 700 pb. El presente estudio revela que las cepas evaluadas por biología molecular cuyo porcentaje de homología según los alineamientos en la base de datos de NCBI, permitieron identificar a las cepas CC062, CC063 y CC068 como *Pleurotus ostreatus*. Imtiaj *et al.*, 2011 obtuvieron fragmentos de 600-800 pb en cepas de *P. djamor*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. ferulae*, *P. nebrodensis*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Alam *et al.*, 2009 reporta que los productos de PCR de la región ITS en nueve diferentes cepas de *Pleurotus nebrodensis* confirmo que las cepas estaban en un intervalo de 575 a 625 pb utilizando oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Se puede observar que los valores concuerdan a los reportados en la bibliografía.

CONCLUSIONES

A pesar de que la cepa CC068 fue la que presento menor velocidad de crecimiento micelial en caja Petri, se observó que las tres cepas evaluadas de *P. ostreatus* alcanzaron mismos rendimientos, eficiencias biológicas y la tasa de producción al no haber diferencias estadísticas significativas entre ellas. Se pudo identificar la especie a la que pertenece cada una de las cepas evaluadas, obteniéndose que las tres fueron clasificadas como *Pleurotus ostreatus*. La estrategia propuesta en esta investigación representa el potencial para el cultivo de las cepas CC062, CC063 y CC068 de *P. ostreatus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, M., Abdullah, N., Ahmed, K. U., & Bhuyan, M. B. (2013). Produtividade e composição nutricional de linhagens de cogumelo-ostra recentemente lançadas em Bangladesh. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(2), 197-202.
2. Alam N, Shim MJ, Lee MW, Shin PG, Yoo YB, Lee TS (2009) Relationship in Different Commercial Strains of *Pleurotus nebrodensis* Based on ITS Sequence and RAPD. *Mycobiology* 37(3) : 183-188
3. Dellaporta, S.L.; Wood, J. & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation version II. *Plant Molecular Biology reporter*. 18: 61-64 pp.
4. Díaz Muñoz, K., Casanova Guajardo, M., León Torres, C. A., Gil Ramírez, L. A., Bardales Vásquez, C. B., & Cabos Sánchez, J. (2019). Producción de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) ICFC 153/99 cultivado sobre diferentes residuos lignocelulósicos. *Arnaldoa*, 26(3), 1177-1184.
5. Gregori A, Suagelj M and Pohleven J (2007) Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*. 45(3):236-247.
6. Huerta G., Martínez- Carrera D., Sánchez J. E., Lara-Lara H. (2009). Grupos de intersterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 31-41.

7. Huerta G., Martínez- Carrera D., Sánchez J. E., Lara-Lara H., Vilgalys R. (2010) Genetic Relationships between mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA. *Micología Aplicada Internacional*. 22(1):15-25.
8. Martínez, C. Morales, P. Sobal, M. Bonilla, M. Martínez, W. (2007) México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. D.F, México, Capítulo 6.1, 20 pp. ISBN 978-970-9712-40-7.
9. Melo de Carvalo C, Sales-Campos C and Noguiera M (2010) Mushrooms of the *Pleurotus* Genus: A review of cultivation techniques. *Interciencia*. 35(3):177-182.
10. Mendoza, H., Juscamaita, J., & Quipuzco, L. (2019). Análisis de la producción del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* obtenida a partir de los subproductos de la etapa de despulpado del café. *Agroindustrial Science*, 9(2).
11. Pavlík, M., & Pavlík, Š. (2013). Wood decomposition activity of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) isolate in situ. *Journal of forest science*, 59(1), 28-33.
12. Rodríguez, G. E., Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., & Agüero, M. S. (2018). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado.
13. Romero-Arenas, O., Ita, V. D., Ángeles, M., Rivera-Tapia, J. A., Tello-Salgado, I., Villarreal Espino-Barros, O. A., & Damián-Huato, M. Á. (2018). Capacidad productiva de *Pleurotus Ostreatus* utilizando alfalfa deshidratada como suplemento en diferentes sustratos agrícolas. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 15(2), 145-160.
14. Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R., & Guzmán, G. (1997). Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14, 173-176.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO A BASE DE FIBRA DE NOPAL

Alondra A. Ortiz Verdín, Elisabeth García Rubio, Karen J. Moreno Hernández, María C.P. Torres Falcón, Brenda S. Dublan Barragán, Gloria F. Mata Don Juan, Madeleine Medina Castillo.

Universidad Politécnica de Querétaro, Carretera Estatal 420 s/n El Rosario, El Marqués, Querétaro.
CP. 76240

alondra.ortiz@upq.mx

RESUMEN

Este proyecto presenta la elaboración de un material compuesto a base de material orgánico ya que se utilizó fibra una planta de producción nacional para su fabricación, el nopal. A lo largo del proceso de elaboración se realizó una investigación ardua sobre su implementación en la industria, además de sus propiedades y campos de oportunidad, culminando en la elaboración de una pieza sencilla a base de este material compuesto, la cual fue sometida a un estudio de compresión para analizar su capacidad, resistencia y la factibilidad de usarlo en el sector automotriz debido a que el esfuerzo último alcanzado fue de 84.30 Mpa, siendo esta una excelente opción para el diseño en interiores tales como detalles en consola central y tablero debido a su baja densidad y originalidad de acabado.

INTRODUCCIÓN

La industria automotriz a nivel internacional es una de las más dinámicas. De acuerdo con la International Organization of Motor Vehicle Manufacturers (OICA, por sus siglas en francés), en el año 2016 se produjeron cerca de 95 millones de vehículos en el mundo, poco menos del 80% en solo 10 países: China (28.1 millones), Estados Unidos (12.2 millones), Japón (9.2 millones), Alemania (6.1 millones), India (4.5 millones), Corea del Sur (4.2 millones), México (3.6 millones), España (2.9 millones), Canadá (2.4 millones) y Brasil (2.2 millones), en orden de importancia.

México actualmente se posiciona como el séptimo país productor automotriz a nivel mundial. Hoy en día, se producen 2.3 veces más unidades que hace 15 años, pasando de 1,772 en el año 2002 a 4,138 en 2017, a una tasa de crecimiento promedio anual de 5.8%, muy superior a la de la economía mexicana en su conjunto. Este crecimiento se refleja tanto en la producción para el mercado interno como en las exportaciones, con mayor peso de estas últimas. (*ProMéxico, abril 2017*).

En México, el empleo de materiales compuestos es amplio en apariencia; sin embargo, pocas o prácticamente ninguna aplicación en elementos mecánicos de máquinas o estructuras, esto es debido al escaso conocimiento que sobre estos materiales se tiene, por lo que un paso fundamental es la evaluación de las propiedades mecánicas y con base en estas, obtener de manera objetiva los parámetros que permitan el diseño de piezas y elementos estructurales.

La necesidad de desarrollar materiales para aplicaciones estructurales en México hace que los trabajos de investigación se realicen con materiales que se puedan ser fácilmente obtenidos. Entre los materiales más conocidos en las aplicaciones automotrices se encuentran el refuerzo con fibra de vidrio (Fibra mineral elaborada a partir de sílice, cal, alúmina y magnesita, *clavosealing 2016*) y la resina poliéster (es la de uso común y está presente en casi la totalidad de embarcaciones de plástico A. *Besednjak*); sin embargo, se carece de información suficiente sobre su comportamiento mecánico, y esto se traduce en que las labores de diseño se lleven a cabo de manera empírica y por lo tanto las aplicaciones se ven restringidas a elementos que no forman parte de la estructura primaria. (*Hernández Moreno Hilario, 2002*).

Los elementos estructurales fabricados con materiales compuestos de matriz polimérica, como por ejemplo los polímeros reforzados con fibras de vidrio o con fibras de carbono, presentan unas excelentes relaciones de rigidez/peso y resistencia/peso, lo que los convierte en idóneos para determinados sectores de producción industrial. A pesar de que existen estudios sobre el comportamiento de estos materiales todavía el conocimiento de los mismos no es absoluto. Por ello surge la necesidad de continuar investigando en este campo. (*Buitrago Pérez Brenda L., 2012*).

Las propiedades mejoradas de los materiales compuestos son un hecho comprobado, sin embargo, existen limitaciones de tipo tecnológico y económico que detienen el desarrollo de estas técnicas. Décadas atrás se inició la exploración en el uso de materias primas alternativas, diferentes a las que se usaban para producir los materiales compuestos anteriores. Tales materias alternativas son diversas, pero básicamente lo constituyen: Fibras vegetales, materias recicladas, y aglutinantes alternativos distintos a los de uso convencional. (Vargas Luis, agosto 2017.)

Las fibras naturales o vegetales han sido objeto de diversos estudios para evaluar su posible aplicación como refuerzo de materiales, porque se pueden adquirir a bajo costo usando la mano de obra y técnicas apropiada para su extracción, están disponibles en grandes cantidades y representan una fuente renovable continua para muchos países en desarrollo (Azis et al., 1981).

La fibra se compone de una mezcla heterogénea de sustancias que, con base en sus propiedades físicas y efecto fisiológico ha sido clasificada en insoluble y soluble (Mejía et al., 1992; Olson et al., 1987). Otra clasificación se debe al lugar de procedencia en la planta las fibras largas (duras o blandas) provienen de la parte del sistema vascular de hojas o del tallo, mientras que las fibras cortas provienen de semillas o frutos y las fibras misceláneas se encuentran en diversas regiones de la planta (Gómez et al., 1998). (Aquino Laura, Rodríguez Juan, Ana Méndez y Susana Hernández, junio 2012).

El nopal es una planta silvestre que sobrevive en regiones desérticas y frías. No requiere de mucha agua para su cultivo, por lo que es una buena fuente de ingresos para muchos agricultores que no cuentan con los recursos necesarios y viven en zonas áridas o semiáridas. Se dice que tiene un papel ecológico importante, ya que detiene la degradación del suelo deforestado, o sea, convierte tierras improductivas en productivas. (Feria nopaleando).

El nopal maduro, de desecho por poda o después de la, no sólo puede aprovecharse como forraje, ya que si se desea su aprovechamiento integral puede implementarse como alimento para consumo humano o como componente de refuerzo en materiales. (Aquino Laura, Rodríguez Juan, Ana Méndez y Susana Hernández, junio 2012)

El objetivo general para el desarrollo del proyecto es elaborar un material compuesto a base de fibra de nopal para que puedan ser una opción de piezas del sector automotriz.

PARTE EXPERIMENTAL

En el diagrama 1 se muestra la metodología experimental utilizada para desarrollar el proyecto a base de un material compuesto con fibra de nopal.

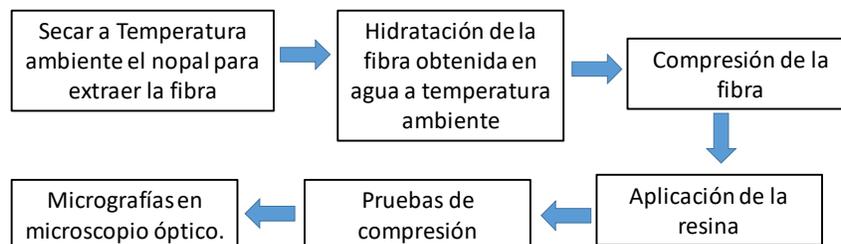


Diagrama 1. Metodología experimental

Para la obtención de la fibra se puso a secar a temperatura ambiente de forma natural el nopal como se muestra en la figura 1. Figura 1 a) se muestra el nopal en su proceso de secado natural a temperatura ambiente aproximadamente durante 2 meses para poder obtener su fibra. En la figura 1 b) se muestra la fibra obtenida después del secado natural.

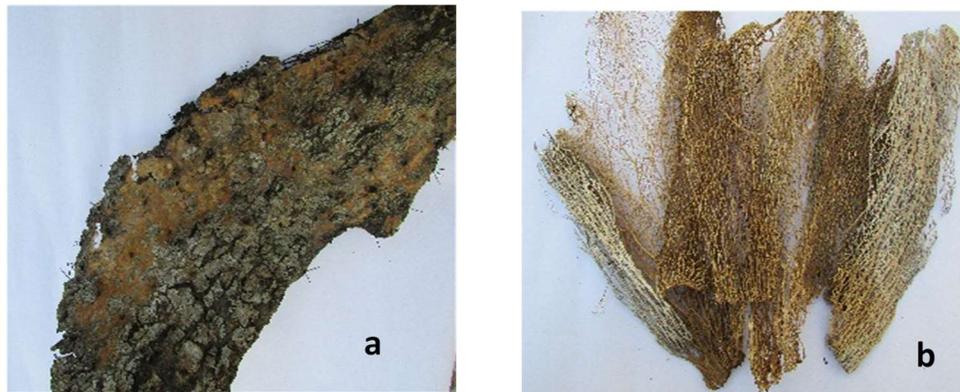


Fig. 1 Obtención de fibra.

En la figura 2 se muestra la fibra hidratada y compactada. Figura 2 a) se observa la hidratación de la fibra obtenida con agua para evitar la ruptura de esta, durante la compactación. Figura 2 b) se muestra la fibra en las placas de acero al carbón para ser compactadas con la prensa hidráulica (200WHVL). Figura 2 c) obtención de la fibra después de su hidratación compactación en la prensa.



Fig. 2 Hidratación y compactación de la fibra.

Para la aplicación de la resina a la fibra se elaboró una mezcla con 100 ml de resina de cristal, un 20% de catalizador K2000 y 10 ml de acetona como diluyente para crear así una resina líquida, que se estuvo disolviendo durante un aproximado de 10 minutos. Para dar forma al material se colocaron dos capas de desmoldante en las placas de vidrio para después colocar entre ellas las láminas apiladas de fibra ya con la resina aplicada y, finalmente se ejerció una presión mediante un peso de aproximadamente 30 kilogramos sobre las placas de vidrio con el fin de obtener un acabado uniforme en la pieza como se muestra en la figura 3.

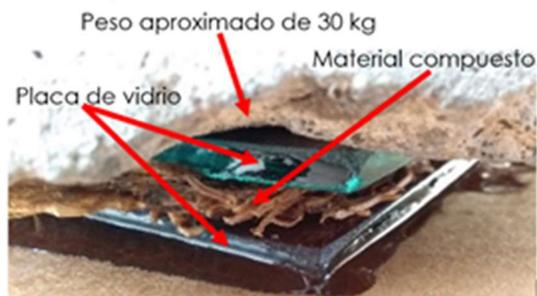


Fig. 3 Aplicación de resina.

RESULTADOS

Se obtuvo una pieza a base de fibra de nopal, la cual de acuerdo a los resultados obtenidos de la compactación con la máquina universal (200WHVL) tiene una alta resistencia ya que se aplicaron 103 toneladas hasta que este colapso, donde se obtuvo un esfuerzo de 84.3 Mpa del material compuesto antes de que la fibra se desquebrajara. En la figura 4 se muestra el material compuesto antes y después de la compactación en la máquina universal.

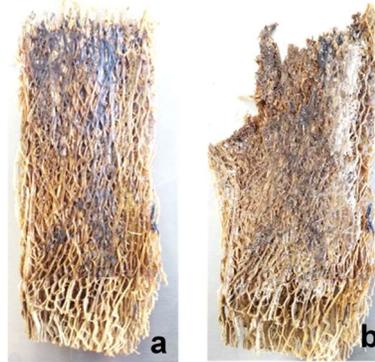


Fig. 4 a) Fibra con resina. a) antes de la compactación. b) después de la compactación.

En la figura 5 se muestran las micrografías obtenidas con el microscopio óptico. Se observa que la fibra natural tiene una longitud en sus filamentos de 1162.3 micrómetros, mientras que el material con dos capas cuenta con una longitud de 1314.6 micrómetros y finalmente el material con tres capas tiene una longitud de 1494.2 micrómetros, tomando como referencia las longitudes más grandes, se puede deducir que entre más capas de resina y mayor compresión se le aplique a las placas los filamentos se vuelven más anchos porque absorben la resina, esta puede ser la razón de que el material sea más resistente contra la fractura.



Fig. 5 a) Fibra natural. b) Material compuesto con 2 capas. c) Material compuesto con 3 capas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son buenos y demuestran que si es posible obtener un material compuesto de alta resistencia a base de fibra de nopal como una posible alternativa para su aplicación en la industria automotriz. En trabajos posteriores se realizará caracterización fisicoquímica, mecánica y su evaluación como material compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aquino L. (2012) *Extraction and characterization of nopal fiber*. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.
2. Buitrago B. (2012) *Comportamiento de estructuras de material compuesto sometidas a cargas impulsivas*. Universidad Carlos III de Madrid.
3. Besednjak A. Capítulo 1. *Los Materiales Compuestos*.

4. Clavosealing (2016) “Fibra de Vidrio tipo E” Recuperado de: http://calvosealing.com/sites/default/files/fibra_de_vidrio.pdf
5. Espinosa M. (2017) “Capacidades de los servicios de I+D+i en la Industria Automotriz Mexicana. ProMéxico
6. Feria Nopaleando recuperado de: https://feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria22/feria252_01_nopaleando.pdf
7. Hernández H. (2002) *Desarrollo de un Material Compuesto para Aplicación Estructural Instituto Politécnico Nacional*
8. Ramírez de Jesús Bidrit P., (2016) Materiales Compuestos en base a fibra de nopal
9. Syarif M. (2018) *Case studies in construction materials*. Recuperado de periódico el Servier: www.elsevier.com/locate/cscm.
10. Torres J. (2016) *Secado de nopal (Opuntia ficus) utilizando secador solar con sistema de reflectores*. Revista de Energía Química y Física Vol.3 No.6 39-46
11. Vargas L. (2007) Uso De Fibras De Papel Periódico, Cal Hidratada Y Alumbre, En La Elaboración De Un Material Compuesto. Universidad de Colima.

DESARROLLO DE FORMULACIÓN FARMACÉUTICA ORAL DE DICLOFENACO ADSORBIDO EN EXCIPIENTE DE SÍLICE POROSA DE CASCARA DE ARROZ

Oscar Efraín Fernández Delgado¹, Mercedes Salazar Hernández², María del Rosario León Reyes¹, Fernanda Nayeli Medrano Lango¹, Carmen Salazar Hernández¹

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato. Instituto Politécnico Nacional. Silao de la Victoria México.

²Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología- División de Ingenierías Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato, Gto México.

*msalazarh@ipn.mx

RESUMEN

Recientemente se ha investigado la posibilidad de emplear diferentes sistemas capaces de actuar como hospederos de fármacos, entre ellos se encuentran las matrices de sílice meso-porosa (SM); cuya estructura interna es una base sólida que alberga poros capaces de adsorber todo tipo de moléculas orgánicas. En este proyecto se estudia la propuesta de diferentes formas farmacéuticas sólidas (comprimidos) adecuadas al sistema (sílice/diclofenaco); las concentraciones del principio activo propuestas en los comprimidos son de 50 y 75 mg, la cuál es la dosis necesaria de administración oral establecida por la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos). En las formulaciones se empleó como diluyente almidón de maíz; como disgregante y aglutinante la sacarosa y talco como lubricante y/o antiadherente. El principio activo fue el diclofenaco adsorbido en la sílice (sílice/diclofenaco) proporcionando la dosis comercial de este fármaco. El tableteo se realizó mediante la formación de granulados y se evaluaron los comprimidos resultantes mediante pruebas de control de calidad de producto terminado en comprimidos tales como: friabilidad, dureza, desintegración, humedad y disolución. Además, se obtendrán los perfiles de liberación del fármaco simulando condiciones fisiológicas (pH y temperatura).

INTRODUCCIÓN

Las tabletas o comprimidos son presentaciones farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria preparadas por moldeo o compresión, que contienen principio activo o fármaco y excipientes. Los excipientes tienen como objetivo proveer la concentración óptima del fármaco al organismo, además, de dar estabilidad química, física y biológica al fármaco. Los excipientes que actualmente se emplean con mayor frecuencia son polímeros naturales, polímeros entrecruzados e hidrogeles [1-3]. La Figura 1a ejemplifica la función del excipiente en una tableta, éste tiene como objetivo atrapar al fármaco y mediante procesos de difusión permitir la liberación del fármaco. Sin embargo, de acuerdo con la Figura 1b; los excipientes se fragmentan de manera no controlado originando que el fármaco se libere con diferentes velocidades e inclusive que parte del fármaco quede atrapado en la tableta, es decir, no todo el fármaco es biodisponible [3].

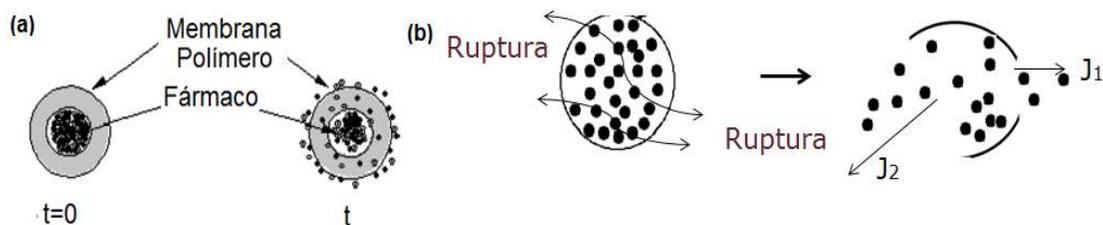


Figura 1. Liberación del fármaco en tabletas (a) Función de excipiente en la presentación farmacéutica (b) Difusión del principio activo [3]

Debido a lo anterior las tabletas convencionales presentan perfiles de liberación de acuerdo con las mostradas en la Figura 2. Una tableta libera rápidamente el fármaco llegando a un máximo de concentración para posteriormente disminuir y perder la actividad biológica, es por ello que a cierto

periodo de tiempo debe realizarse una segunda o tercera dosificación. Sin embargo, existen sistemas de liberación prolongada, los cuales liberan un máximo de concentración del fármaco y continúan liberando esta cantidad por un periodo de tiempo [4]

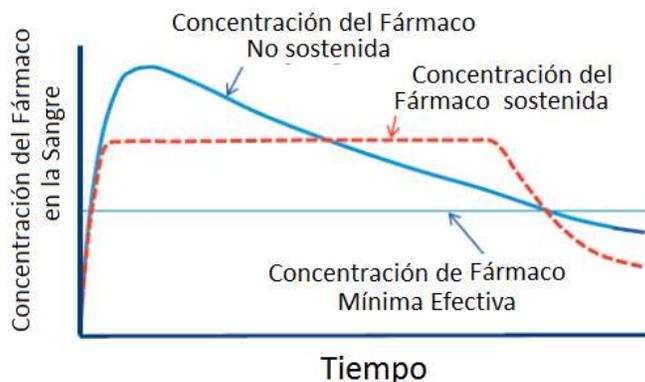


Figura 2. Perfiles de liberación para formulaciones farmacéuticas [4]

Recientemente, se investigan nuevos excipientes que permitan la liberación sostenida y controlada del fármaco, tales como son los hidrogeles [5] y la sílice mesoporosa. La sílice mesoporosa ordenada es un sólido con huecos cilíndricos en los cuales se atrapa el fármaco y a través de interacciones electrostáticas o bien por puentes de hidrógeno se logra el control de la velocidad de liberación de los fármacos [6-9]. La Tabla 1 muestra una lista de fármacos que han sido adsorbidos en excipientes base sílice mesoporosa, nanopartículas de sílice, partículas de sílice modificadas, etc. [10]. En todos los reportes se indica un excelente comportamiento de la sílice como excipiente mejorando el porcentaje de liberación del fármaco y logrando en su mayoría perfiles de liberación continua y sostenida.

Tabla 3.1 Ejemplo de fármacos adsorbidos en excipientes base sílice [10]

Medicamento	Farmacología	Portador	Absorción	Liberación
Doxorrubicina	Anticancerígeno	Fe ₃ O ₄ tipo traqueteo y βCD impedido por MSN _s	Interacción electrostática	Disolución y difusión controlada y liberación sensible al pH
Ibuprofeno	Antiinflamatorio/a analgésico	Fe ₃ O ₄ funcionalizado por SBA-15, y MSN _s huecos cubiertos con multicapas PAH / PSS	Adsorción física y enlace de hidrógeno e Impregnación simple	Difusión controlada y liberación sensible al pH
Dexametasona	Antiinflamatorio	Fe ₃ O ₄ NP _s impedido por MSN _s	Impregnación	Liberación sensible al pH
Eritromicina	Antibiótico	SBA-15 modificado por grupo hidrófobo	Impregnación	Difusión controlada
Alendronato	Anti-psoriásica	Grupos modificados de Propilamina por MCM-41 y SBA-15	Atracción electrostática	Difusión controlada

En este proyecto se propone el desarrollo de una presentación farmacéutica oral para el diclofenaco sódico que es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, empleando como excipiente de liberación sostenida y controlada; la sílice biogénica obtenida de la cascarilla del arroz (SiO_2 -arroz). Se discutirá el desarrollo de la pre-formulación, la elaboración de las tabletas; así como la realización de pruebas de estabilidad y finalmente la cinética de liberación del fármaco.

PARTE EXPERIMENTAL

Extracción de la SiO_2 -arroz: La SiO_2 -arroz se obtuvo de acuerdo con la metodología reportada por M. Salazar-Hernández [11]; donde la cascarilla se limpia para eliminar los desechos (polvo, tierra y basura) posteriormente se realiza una preoxidación de la materia orgánica colocando la cascarilla en 240 mL de agua regia, calentando hasta ebullición durante 1 h y dejando reposar por 12 horas. La cascarilla tratada se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 hr para posteriormente ser calcinada en atmósfera oxidante a 650°C por 2 h empleando un horno circular eléctrico Thermoscientific F-21135.

Adsorción del Fármaco en la SiO_2 -arroz: La adsorción de 200 mg de diclofenaco sódico en la sílice se realizó por impregnación simple empleando como disolvente isopropanol /agua; el tiempo de adsorción fue de 1h de tiempo de adsorción. La cantidad de fármaco adsorbido se cuantificó por método gravimétrico.

Pre-formulación: La estabilidad del principio activo con los excipientes empleados se determinará realizando mezclas binarias de excipiente-fármaco con una composición de 0.2 g excipiente, 0.2 g fármaco adsorbido en la sílice, después se colocarán a temperaturas de 40°C por 4 meses, para finalmente determinar la compatibilidad del excipiente-fármaco mediante espectroscopia IR. La Tabla 52 indica los excipientes propuestos para la elaboración de las formulaciones.

Tabla 2. Mezclas excipiente/fármaco propuestas para el estudio de compatibilidad

Excipiente	Función en la Formulación	Mezcla para el estudio de estabilidad
Diclofenaco/ SiO_2	Principio Activo	Sin mezcla
Almidón	Diluyente 1	Principio activo/ diluyente
Sacarosa	Desintegrante	Principio activo/desintegrante
Talco	Lubricante	Principio activo/ Lubricante

Elaboración de tabletas: Compresión húmeda. Se prepararon granulados empleando los componentes que se indican en la Tabla 3. Antes de realizar la compresión, el granulado se mezclara con talco (lubricante) para alimentar la mezcla a la tableteadora marca Vanguard Pharmaceutical Machinery, inc. USA.

Tabla 3. Cantidades empleadas para la obtención de las formulaciones

Formulación	Excipientes	Cantidades propuestas	
		mg	% en peso
A1	Diclofenaco/SiO ₂ -arroz	56	0.2
	Almidón	112	0.4
	Sacarosa	112	0.4
	Talco	0.8	0.003
A2	Diclofenaco/SiO ₂ -arroz	56	0.2
	Almidón	149	0.27
	Sacarosa	75	0.53
	Talco	0.8	0.003
A3	Diclofenaco/SiO ₂ -arroz	56	0.2
	Almidón	75	0.53
	Sacarosa	149	0.27
	Talco	0.8	0.003

Ensayos de comprimidos: Dureza. Se midió la fuerza requerida para que la tableta se facture empleando un durómetro digital Vanguard Pharmaceutical Machinery, inc. USA con orientación horizontal de la fuerza.

Ensayos de comprimidos: Friabilidad. Esta prueba se realizó empleando un Friabilizador marca Vanguard Pharmaceutical Machinery, Inc. USA; se emplearon en cada prueba 10 tabletas, las cuales se sometieron a efectos de golpes y abrasión por 4 min. Al finalizar la prueba se registró la pérdida de peso considerando una friabilidad de 0.0 a 1.0% de pérdida de peso como aceptable.

Ensayos de comprimidos: Desintegración. Esta prueba se realizó en un disolutor Vanguard Pharmaceutical Machinery, se colocó una tableta por pozo en un vaso de precipitado y se sumerge en agua destilada a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, se registró el tiempo que tarda la tableta hasta que comenzó a observarse la desintegración.

Fármaco Cinética: Se realizaron las cinéticas de liberación del fármaco por triplicado para cada formulación. Las condiciones de desorción empleadas fueron: temperatura constante de 37°C , pH de 5 y 7 ajustados con HCl. La cuantificación del fármaco liberado a diferentes tiempos se realizó empleando la ley de Beer-Lambert midiendo los cambios de absorción en un espectrofotómetro UV-Visible Cintra-6.

RESULTADOS

Extracción de SiO₂-arroz y Adsorción del Fármaco

La Figura 3a presenta el espectro de infrarrojo obtenido para la SiO₂-arroz, la cual conserva la morfología de la cascarilla. De acuerdo con el espectro, se observa la adsorción de agua en su estructura como una banda ancha intensa a $3400\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. Los siloxano (Si-O-Si) fueron identificados a 1100 cm^{-1} y 793 cm^{-1} ; mientras que silanoles libres se asignaron para la banda a 945 cm^{-1} . La presencia de silanoles en la superficie de la sílice permite la adsorción del fármaco a través de la formación de puentes de hidrógeno (Figura 3b).

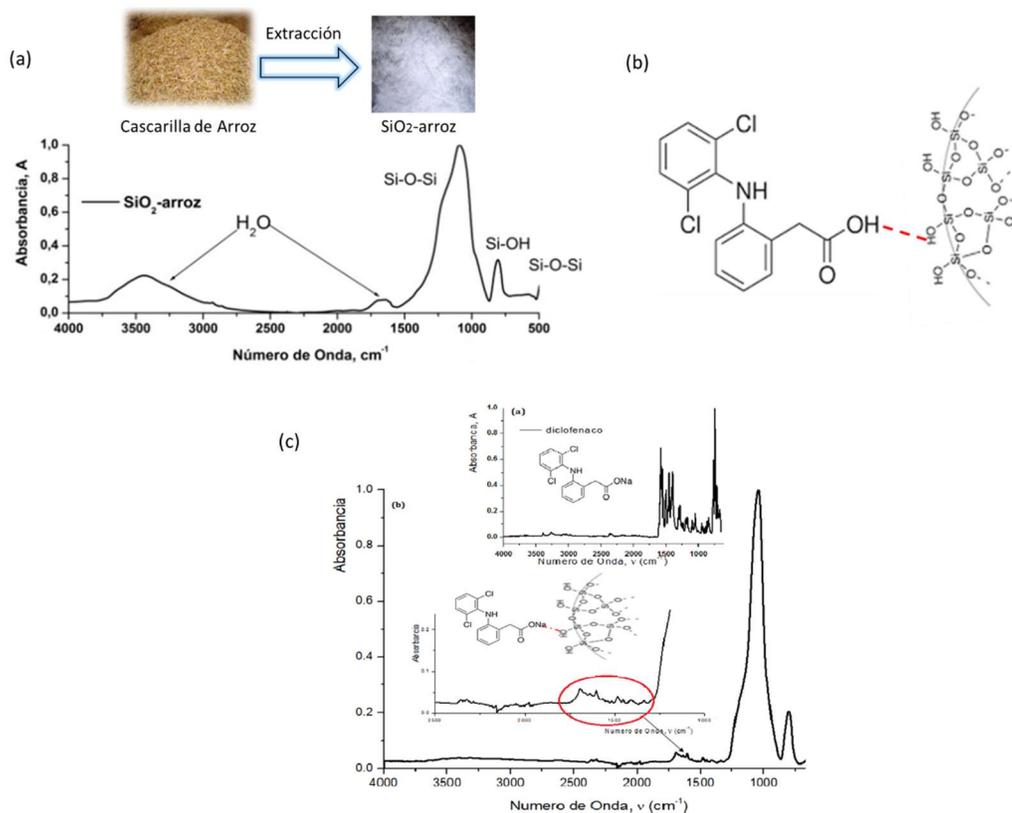


Figura 3. (a) Espectro de infrarrojo para SiO₂-arroz (b) Interacción entre el diclofenaco y la superficie de la SiO₂-arroz (c) espectro de infrarrojo para diclofenaco adsorbido en SiO₂-arroz

La Figura 3c muestra el espectro infrarrojo de adsorción de diclofenaco en la SiO₂-arroz; donde puede apreciarse el diclofenaco adsorbido en sílice con las señales a números de onda de entre 1400-1600 cm⁻¹ y a 750 cm⁻¹. Antes de formular es necesario determinar la cantidad de principio activo adsorbido en la sílice; lo cual se realizó por gravimetría observándose una capacidad de adsorción del 17.35% en peso.

Elaboración de Pre-Formulación: Compatibilidad entre excipientes y SiO₂-arroz

Para corroborar la compatibilidad de la sílice con cada uno de los excipientes propuestos para la realización de las formulaciones es necesario determinar si estos son compatibles con la sílice. La Figura 4 muestra los espectros de infrarrojo para las mezclas de excipiente/SiO₂-arroz expuestas a 40°C por un periodo de 4 meses. No se observaron señales que indiquen la posible descomposición de los excipientes, por lo cual podrían ser empleados como excipientes para el principio activo.

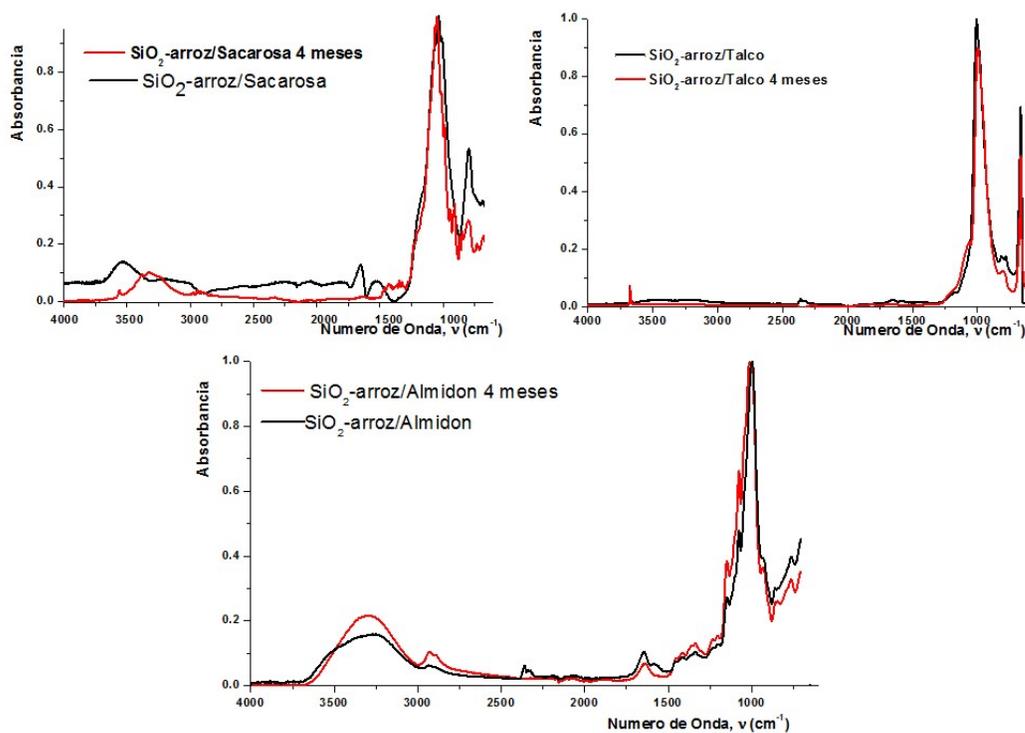


Figura 4. Espectros de infrarrojo para las mezclas SiO₂-arroz con almidón, sacarosa y talco (1:1) a temperatura ambiente.

Prueba de Calidad para Granulado

Los granulados deben cumplir características reológicas que permitan su fácil compresibilidad y con ello la elaboración de tabletas. La Figura 5a muestra los granulados estudiados, los cuales tienen morfología esférica con tamaño de partícula generado por el tamiz-100. Entre las propiedades que afectan la compresión se encuentra la humedad; la cual se recomienda sea menor al 5%; la Figura 5b muestra la humedad promedio determinada para cada formulación obteniendo valores del 5% (PA1 y PA3) hasta el 7% para PA2. En cuanto al ángulo de reposo (Figura 5c) y el índice de Carr's (Figura 5d) ambas propiedades se encuentran dentro de las recomendadas; ángulos menores al 45° y porcentajes de compresibilidad mayores al 5%.

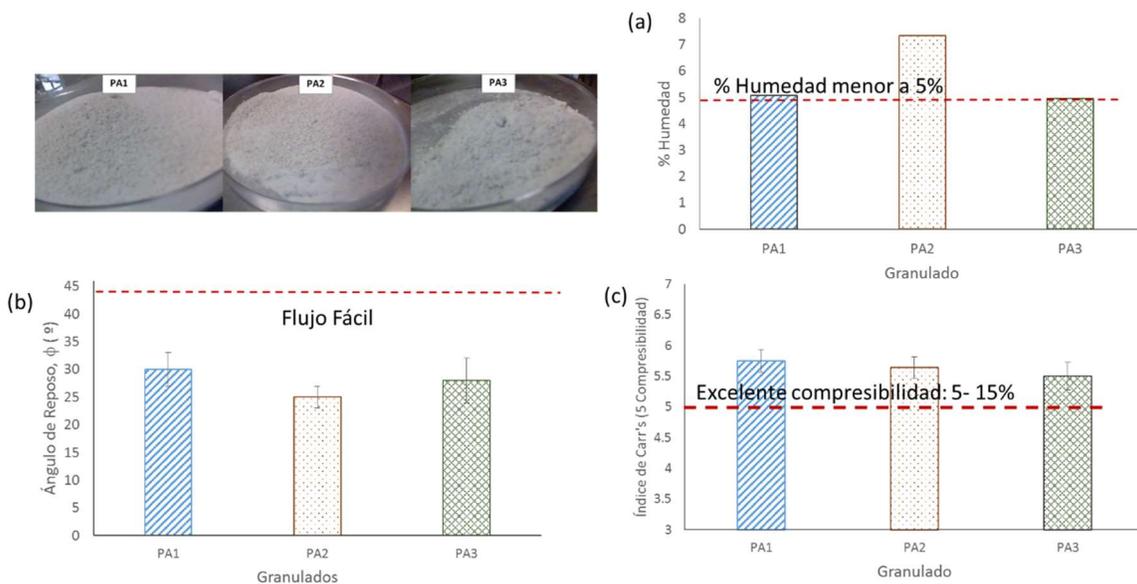


Figura 5. Caracterización reológica de los granulados (a) Granulados (b) porcentaje de humedad (c) ángulo de reposo (d) índice de compresibilidad

Prueba de Calidad para Tabletas

La Figura 6 muestra las propiedades físicas evaluadas en los comprimidos obtenidos con las tres formulaciones; como puede observarse, la variación de la altura y diámetro fue baja; las cuales se deben a factores inherentes al equipo y no a la formulación. Por otra parte, la dureza de las tabletas se encontró entre $4.24 \pm \text{kgf/cm}^2$ y $9.59 \pm 0.93 \text{ kgf/cm}^2$; teniendo el valor menor A2 y el mayor A1. La dureza de las tabletas está relacionado con la friabilidad o desgaste por abrasión, la cual debe tener un valor menor al 1%; para las formulaciones propuestas se determinaron friabilidad de 0.37% para A1 y 0.1% para A23 y A3. El comprimido A1 presentó la mayor friabilidad ya que al tener una mayor dureza, el comprimido se comporta como un material frágil por lo cual incrementa su friabilidad.

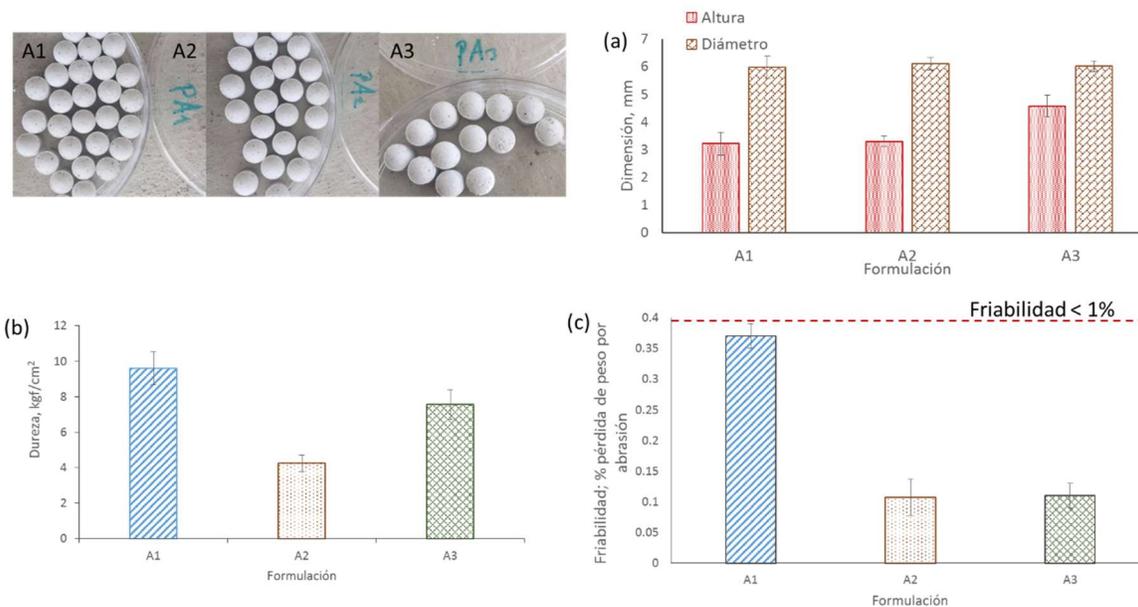


Figura 6. Pruebas de calidad para las formulaciones estudiadas (a) Variación de dimensiones (b) Dureza (c) Friabilidad

Prueba de Biodisponibilidad

La Figura 7 muestra los resultados correspondientes a la biodisponibilidad; en cuanto al tiempo de desintegración todas las formulaciones presentaron tiempos mayores a los 5 min y menores a los 30 min (Figura 7a) lo recomendado por la FEUM. Por otra parte, los perfiles de disolución (fármaco cinética) fueron dependientes del pH; donde para la formulación comercial a pH de 7 se tiene la velocidad de desorción del principio activo mayor con una cinética de disolución de orden cero; mientras que las formulaciones con sílice presentaron una cinética de pseudo-orden observándose una mayor velocidad de desorción para A1; seguida de A3 y A1.

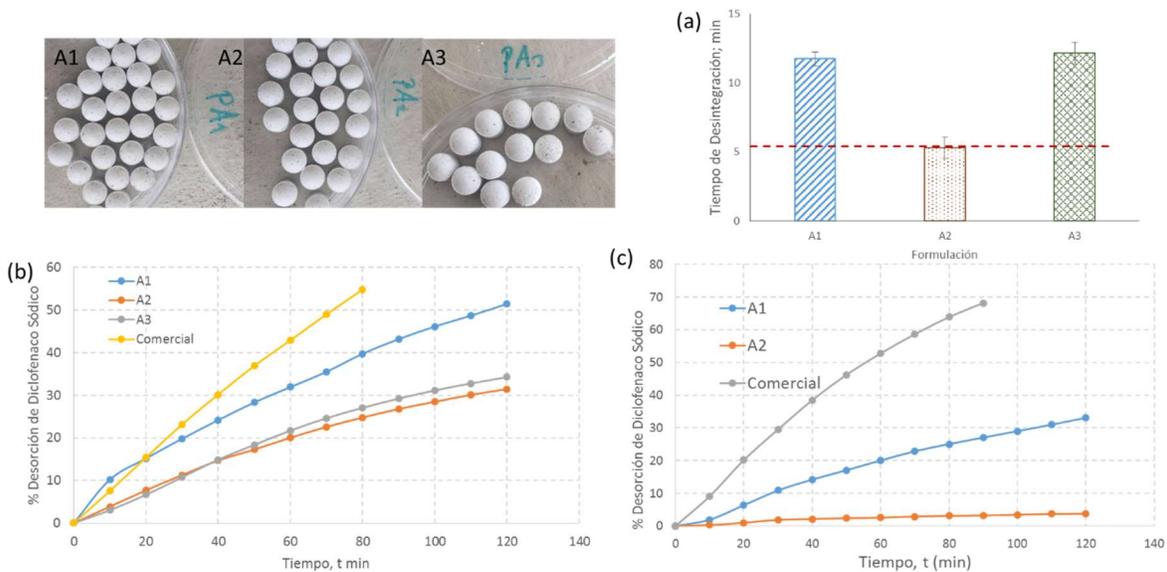


Figura 7. Pruebas de Biodisponibilidad (a) Desintegración (b) Fármaco-cinética a pH de 7 (c) Fármaco-cinética a pH de 5.

CONCLUSIONES

La sílice biogénica actúa como un excipiente que adsorbe en su interior al diclofenaco dándole estabilidad química y mecánica al mismo fármaco; sin embargo, se necesita añadir mayores cantidades de excipientes a la formulación como: Almidón de maíz y sacarosa para formar comprimidos resistentes sin utilizar presiones elevadas que podrían descomponer al fármaco adsorbido en la sílice.

Las tres formulaciones propuestas mostraron propiedades mecánicas aceptables, excelente fluidez y capacidad de compresibilidad, así como una desviación estándar considerable en las características posológicas, comprobando de esta manera que la presencia de excipientes como almidón y sacarosa, así como un acarreador hidrofílico poroso, mejoran la fluidez y la compresión de la mezcla de polvos, obteniéndose tabletas que presentaban las características físicas demandadas por la FEUM

BIBLIOGRAFÍA

1. Varum F.J.O., Merchant H.A., Basit A.W. Oral modified-release formulations in motion: The relationship between gastrointestinal transit and drug absorption. *Int. J. Pharm* (2010) 395:1–2.
2. Deshpande A.A., Rhodes C.T., Shah N.S., Malick A.W. Controlled-release drug delivery systems for prolonged gastric residence: An overview. *Drug Dev. Ind. Pharm* (1996) 22:531–539.

3. Martin del Valle E.M., Galan M.A., Carbonell R.G. Drug delivery technologies: The way forward in the new decade. *Ind. Eng. Chem. Res.* (2009) 48: 2475–2486.
4. Park K., Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *J Control Release* (2014)190:3-8.
5. Caccavo D., Cascone S., Lamberti G., Barba A.A, Larsson A, Swellable Hydrogel-based Systems for Controlled Drug Delivery. *Smart Drug Delivery System* Edited by Ali Demir Sezer (2016) pp: 237-303. ISBN: 978-953-51-2247-0
6. Anderson J., Rosenholm J., Linden M. Mesoporous Silica: An alternative diffusion controlled drug delivery, *Topics in multifunctional biomaterials & device*, Edited by Ashammaki (2008) p.
7. Jie-Lu M.D, Zongxi L, Zink J.I, Tamanoi F., In vitro tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug delivery system: enhanced efficacy by folate modification, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2012) 8, 212-220.
8. Suriyanon N, Punyapalakul P, Ngamcharussrivichai C.H, Mechanistic study of diclofenac and carbamazepine adsorption on functionalized silica-base porous materials, *Chemical Engineering Journal*, (2013) 214: 208-218
9. Vialpando M, Backhuijs F, Martens A, den Mooter G.D, Risk assessment of premature drug release during wet granulation of ordered mesoporous silica loaded with poorly soluble compounds itraconazole, fenofibrate, naproxen and ibuprofen, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2012) 81: 190-198
10. Bredenberg S, Nystrom C. In vitro evaluation of bioadhesion in particulate systems and possible improvement using interactive mixtures. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55: 169-177.
11. Salazar-Hernández M, Salazar-Hernández C, Gutiérrez-Fuentes A, Elorza E, Carrera-Rodríguez M, Puy-Alquiza M.J, “Silica from Rice Husks Employed as Drug Delivery for Folic Acid”, *J. Sol-Gel Sci and Technl*, 71, 3, 2014, pp. 514-521.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaria de Investigación y Posgrado (SIP) del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo brindado a través del proyecto de Innovación 20196850 y 20200941.

LA LEPTINA EN EL NTSC AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES OB-RB Y POTENCIA LA RETENCIÓN DE GLUCOSA CEREBRAL INDUCIDA POR NACN EN EL SENO CAROTÍDEO EN RATAS

Torres-Magallanes JA¹, Lemus M¹, Mojarro C¹, Montero S^{1,2}, Ramírez-Flores M^{1,2}, Roces de Álvarez-Buylla E¹.

¹Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas y ²Facultad de Medicina, Universidad de Colima, México.
rab@ucol.mx.

RESUMEN

El núcleo del tracto solitario comisural (NTSc) responde a los niveles de glucosa, a las señales hepatoportales y a los quimiorreceptores carotídeos (QRC), por otro lado, los receptores de leptina, principalmente los de la isoforma larga (Ob-Rb), se expresan también en el NTSc, donde su activación con la leptina reduce la ingesta alimentaria, el peso corporal, la glucemia y la retención de glucosa cerebral (RGC), a través del sistema simpático¹ y la glándula adrenal como indican otros autores². El objetivo de nuestro estudio fue determinar si la leptina, precedida por un estímulo anóxico (cianuro de sodio-NaCN) en el seno carotídeo aislado de la circulación sistémica (ICS) modifica el ARNm de los genes Ob-Rb de la expresión de leptina, y el gen c-Fos, marcador de actividad neuronal reciente, así como la RGC. Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho con peso corporal de 270 a 300 g, mantenidas en ciclos de luz/oscuridad 12/12, y con alimento y agua con glucosa al 10%, ad libitum. Los experimentos se realizaron en ayuno de 12 horas. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (3,3 mg/100 g vía i.p.), y con mantenimiento del mismo anestésico (0.063 mg/min en salina, i.p.). El nivel de anestesia se controló por los reflejos palpebral y plantar, se utilizó buprenorfina (0.03 mg / kg subcutáneo) como analgésico. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C. Las ratas se ventilaron artificialmente (ventilador Ugo Basile, Stoelting, Wood Dale IL, E.U.) a través de una cánula traqueal que nos permitió ajustar la velocidad y el volumen respiratorios para mantener los valores homeostáticos (pO₂, pCO₂ y pH). El protocolo experimental consistió en 40 ratas sanas divididas al azar en cuatro grupos: a) experimental 1, infusión de leptina en el cNTS y NaCN en el seno carotídeo aislado (ICS) (n = 10); b) experimental 2, infusión de leptina en el cNTS y salina en el ICS (n = 10); c) control 1, líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) en el cNTS y NaCN en el ICS (n = 10); d) control 2, infusión de aCSF en el cNTS y salina en el ICS (n = 10). Los resultados muestran que la leptina en el NTSc, precedida por un estímulo anóxico (cianuro) en los QRC, aumenta la retención de glucosa cerebral y la expresión del ARNm del receptor Ob-Rb de leptina, con aumentos no significativos en el ARNm de C-fos en el NTSc. Se concluye que la leptina en el NTSc potencia la retención de glucosa cerebral inducida por un estímulo anóxico en los QRC, a través de un aumento de los receptores Ob-Rb sin una participación significativa de C-fos en este núcleo.

INTRODUCCIÓN

Está demostrada la existencia de neuronas glucosensibles en áreas hipotalámicas y del tallo cerebral, Esta demostrada la existencia de neuronas glucosensibles en áreas hipotalámicas y del tallo cerebral, como el NTS que constituye el primer centro de relevo para las funciones viscerales, y es capaz de influir sobre la activación diferencial del sistema nervioso simpático y la médula adrenal, estructuras importantes en la homeostasis de la glucosa (3); es en el NTS donde las fibras aferentes quimiorreceptoras hacen las sinapsis iniciales con el SNC (4,5). Se ha demostrado una correlación entre concentración de glucosa y actividad quimiorreceptora de los receptores del cuerpo carotídeo (RCC) (6,7,8). El NTSc, además de responder directamente a la glucosa (3), responde también a las señales procedentes de aferencias hepatoportales glucosensoras (9) y a la mayor parte de las terminales aferentes de los RCC (10,11). Estudios recientes muestran que los receptores a leptina Ob-Rb se expresan en el NTSc (13), y la administración de leptina en este núcleo reduce la ingesta de alimentos y el peso corporal (12). Se sabe que las neuronas que expresan la forma larga del receptor de leptina (ObRb), al menos en dos grupos distintos dentro del núcleo caudal del

NTS: un grupo dentro del NTS lateral (Sit) y otro dentro del NTS medial (Sm) y gelatinosa (Sg) (13). La leptina, hormona derivada de la grasa, es conocida por regular el peso corporal debido a sus acciones sobre la ingesta de alimentos, el gasto de energía o el peso corporal (14, 15). Sin embargo, esta hormona en el NTSc también desempeña un papel principal en la homeostasis de la glucosa (15). En este trabajo se analizan los efectos de la leptina infundida en el NTSc sobre la retención de glucosa por el cerebro y la expresión del gen *Ob-Rb* inducidos por un estímulo anóxico en el SCA de la circulación sistémica y cerebral in vivo en ratas Wistar.

PARTE EXPERIMENTAL

Consideraciones éticas y de bioseguridad. Los experimentos fueron aprobados por el comité de la Universidad de Colima (No. 2014–02). Se llevaron a cabo en el laboratorio de Neuroendocrinología del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas en ratas (*Rattus norvegicus*), con apego a la guía de la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (16).

Materiales y fármacos. Buprenorfina (Schering Plough, Temgesic, Méx, 0.005 mg / 100 g i.m.) (17); aCSF (NaCl 145 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM, ácido ascórbico, C₆H₈O₆ 0.2 mM, NaH₂PO₄ 2.0 mM, en 100 ml de agua tridistilada con un pH de 7.3-7.4) (20 nL) (20 nL) (18); leptina (Sigma, Méx.) (50 ng / 20 nL en aCSF); solución salina (Pisa, Méx.) (0.9% 50 nL) (6); cianuro de sodio (NaCN) (Fluka Biochemica, Sigma, Méx. 5 µg / 100 g / 50 nL de solución salina) (6); pentobarbital de sodio (Pfizer, Méx.) (3 mg / 100 g mL solución salina) (6); azul de metileno (Sigma-Aldrich Co, Mex) (50 nL en aCSF).

Protocolo experimental. Se utilizaron ratas macho Wistar de 270 a 300 g de peso, 4 meses de edad, sanas, alojadas de manera individual, en el bioterio del CUIB, en condiciones de luz-obscuridad 12h/12h, a temperatura de 24°C, con libre acceso a agua y alimento Rodent Laboratory Chow. Se utilizaron 40 ratas divididas en 4 grupos al azar: a) control 1: microinyección de aCSF (20 nL) en NTSc + salina (50 µL) en SCA (aCSF + Sal) (n=10); b) control 2: microinyección de aCSF + NaCN (aCSF + NaCN) (5 µg/100 g/50 µl salina) (n = 10); c) experimental 1: leptina (50 ng/20 nL, Sigma, México) + salina (Lep + S al) (n = 10). d) experimental 2: leptina + NaCN (Lep + NaCN) (n = 10).

Anestesia y cirugía general. La comida se retiró 12 h antes de la cirugía, se administró agua con glucosa al 10% a libre acceso; para mantener los niveles de glucosa estables durante la cirugía. Se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal (ip) (3.3 mg/100 g/ solución salina, Pfizer, Mex) en bolo; e infusión continua, con pentobarbital, a una dosis (0.063 mg/ 100 g/ min diluida en solución salina); se monitoreó la profundidad de anestesia con reflejo palpebral y pinchamiento de la pata (6). Para la analgesia se administró buprenorfina subcutánea (0.03 mg/ kg, Temgesic, Schering-Plough, México). La temperatura corporal se mantuvo por medio de un cojín térmico a 37 ± 1°C. Durante la cirugía los animales se mantuvieron con ventilación artificial (ventilador Hugo Basille, Stoelting) por medio de una cánula traqueal, velocidad ajustada y volumen para mantener los valores homeostáticos de pO₂, pCO₂ y pH (15).

Preparación del SCA y estimulación de los RCC. Para aislar temporalmente el SC de las circulaciones cerebral y general (SCA), se introdujo un catéter de polietileno (Clay Adams PE-10) previamente heparinizado (1000 U/mL) por la arteria lingual hasta llegar a seno carotídeo (5mm anterior a la bifurcación carotídea), se ligó temporalmente la arteria carótida común, durante las inyecciones de NaCN (5 µg/100g) (estimulación de los RCC) o salina en el SCA a través de la arteria lingual (6).

Cateterización arterial y venosa. Para la determinación de la RGC, se insertó un catéter de polietileno (PE-10 Clay Adams) en la arteria femoral y un tubo de silastic (Dow Corning 602-155) accediendo por la vena yugular externa hasta llegar al seno yugular (6).

Trepanación para acceso de cánula. Se colocó la cabeza de la rata en un estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL USA) y se incidió hasta el pericráneo. La superficie se limpió con peróxido de hidrógeno. Por medio del sistema tridimensional de coordenadas (Paxinos y Watson) se localizaron las estructuras cerebrales seleccionadas (19), se consideró a lambda como punto de referencia (cero de las coordenadas), y se determinaron las coordenadas para fijar el lugar de la trepanación, antero-

posterior - 5.1 mm, lateral-medial - 0.1 mm y dorsal-ventral 8.1 mm a partir de la superficie del cráneo (19). Se realizó la craneotomía con una fresa de carbono de 1/32 pulgadas, sin dañar la superficie del cerebro, se introdujo una cánula de vidrio (40-50 μm de diámetro externo de la punta, Microcaps) para realizar las micro-inyecciones de los distintos fármacos con trauma mínimo.

Microinyecciones en el NTSc. La cánula se conectó a una microjeringa Hamilton de 0.1-0.5 μL con tubo de silastic (20,21). La leptina o el aCSF /PBS se administraron 4 min antes de las inyecciones de NaCN o salina en el SCA. Al final de cada experimento, se marcó el lugar de la infusión de fármacos con azul de metileno (50 nL en aCSF) inyectado por la misma cánula.

Determinación de RGC. La sangre arterial (5 μL) se recogió a través del catéter femoral y la sangre venosa (5 μL) mediante el catéter yugular. La concentración de glucosa en sangre se determinó con un glucómetro digital (ACCU-CHEK Performa, Roche, México) en $\mu\text{mol} / \text{mL}$. En cada rata, se tomaron dos muestras arteriales y dos basales venosas, con un intervalo de 5 minutos; los valores se promediaron para obtener un nivel basal de concentración de glucosa. Después de la inyección de NaCN o solución salina en el SCA ($t = 0$), se recogieron cuatro muestras experimentales a $t = 5$ min, $t = 10$ min, $t = 20$ min y $t = 30$ min. El volumen de sangre tomado de los vasos canulados representó aproximadamente el 0,002% del volumen circulante total. Para compensar el volumen sanguíneo, después de cada par de muestras tomadas, se inyectaron 0,1 mL de solución salina i.v. El flujo sanguíneo carotídeo se monitorizó con un medidor de flujo doppler pulsado ultrasónico (Bioingeniería, Univ. Iowa), se colocó alrededor de la arteria carótida común derecha sin alterar la circulación sanguínea y se registró en mL/g/min (22,23). La retención de glucosa en el cerebro se calculó en $\mu\text{mol/g/min}$ multiplicando las diferencias de glucosa arteriovenosa por el flujo sanguíneo carotídeo (6). El sitio correcto de los catéteres se verificó una vez terminado el experimento (6).

Sacrificio y preparación de tejido cerebral con criotomo. Una vez terminados los experimentos, y bajo anestesia, las ratas se decapitaron con guillotina (24). Los cerebros se extrajeron y congelaron a -70°C en un ultracongelador (Revco), y se cortaron, posteriormente, en forma coronal (40 μm de espesor) en un criomicrotomo (Leica CM-1800). Las secciones del cerebro se montaron en un portaobjetos, se tiñeron con violeta de cresilo al 0.5 % (19) se cubrieron con Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) y analizaron en un microscopio estereotáxico equipado para fotografía (Zeiss AxioCam Carl Zeiss, Munich Germany, Software Axio Vision 4.8, 2009). Se verificó el lugar de inyección del azul de metileno y las ratas con inyecciones inapropiadas se eliminaron del protocolo experimental (20,21).

Medición en NTSc de leptina y C-fos con RT-PCR. Se colectó un total de 100 mg de tejido cerebral, se agregó 1 mL de TRIzol® Reagent (Ambion by Life Technologies™) y se congeló a -70°C . Las muestras se homogenizaron usando un procesador ultrasónico (Cole-Parmer, modelo GEX130), se extrajo el ARN por el método TRIzol® Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen™) y para la síntesis se tomó el Primer oligo (dT)20 de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de la expresión génica. Se utilizó el kit LightCycler FastStar DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) para la amplificación del gen por PCR Tiempo-Real, desarrollada en un volumen total de 20 μL que contiene: 1X Master Mix (FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, dNTP mix, SYBR Green I dye and MgCl_2), 0.5 μM de cada primer, 10 μL e ADNc. Los primers utilizados para el gen Ob-Rb fueron forward 5'-ATGAAGTGGCTTAGAATCCCTTCG-3' y reversa 5'-ATATCACTGATTCTGCATGCT-3' (25); para C-fos forward 5'-GGGATAGCCTCTCTTACTACCACT 3' y reversa- 5'CCTCCTGTCATGGTCTTCACAA C-3'34 (26) mientras que para b-actina forward 5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3' y reversa GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3' (27). La amplificación y detección fue desarrollada usando Eppendorf MasterCycler RealPlex de la siguiente manera: pre-incubación: un ciclo de 95°C , 10 min; amplificación y cuantificación: 45 ciclos de 95°C , 10 seg, 58°C 15 seg, 72°C 10 seg; curva de fusión (melting curve) 95°C , 0 seg, 65°C ; 15 seg, 95°C ; 0°C (incluye rampa de temperatura de 0.1°C y detección continua de fluorescencia); y enfriamiento: 1 ciclo 4°C , por tiempo indefinido.

RESULTADOS

Retención de glucosa cerebral: La figura 1 muestra un aumento significativo de RGC en los grupos Lep + NaCN y aCSF +NaCN (estímulo anóxico) comparados con sus valores basales. No hubo cambios significativos en los grupos Lep + Sal y aCSF +Sal (sin estímulo anóxico) respecto a sus valores basales. Los valores de Lep + NaCN fueron significativamente más altos que aCSF + NaCN solo para los tiempos 10 min y 30 min.

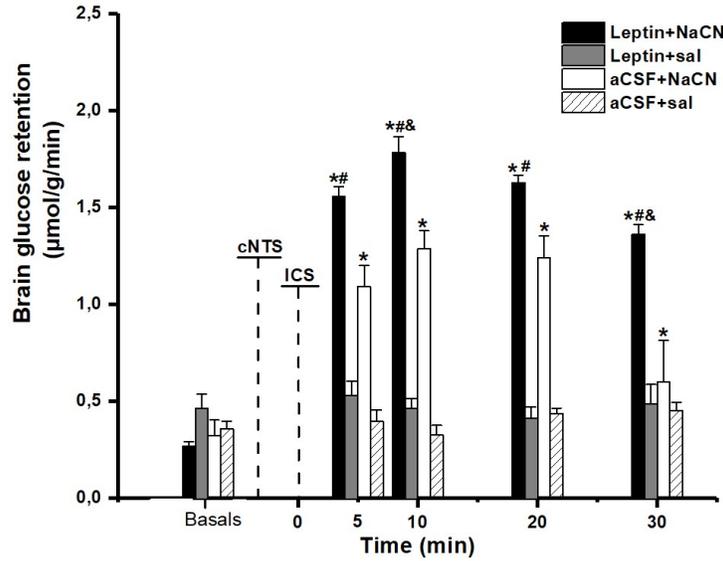


Fig. 1. RGC en ratas con inyecciones de leptina o aCSF en NTSc antes de estímulo con NaCN o solución salina en SCA. (medias ± error estándar de la media), *p < 0.05 media de cada grupo vs su valor basal; #p < 0.05 Lep+ NaCN vs Lep+Sal; &p < 0.05 Lep + NaCN vs aCSF +NaCN.

Niveles de mRNA de receptores Ob-Rb de leptina: La figura 2 muestra los niveles de expresión relativa de mRNA para Ob-Rb. Los niveles de ARNm aumentaron significativamente al comparar Lep + NaCN vs aCSF + NaCN, sin observarse efectos significativos al comparar Lep + Sal vs aCSF + Sal respectivamente.

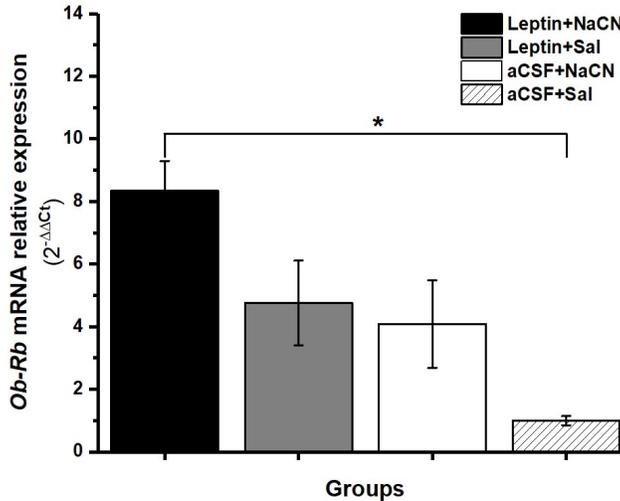


Fig. 2. Expresión relativa de receptores de leptina de ARNm de Ob-Rb en ratas con inyección de leptina o aCSF en NTSc antes de NaCN o solución salina en SCA. (medias ± error estándar de la media) *p < 0.05.

Niveles de expresión relativa de mRNA para el gen C-fos: En la figura 3 observamos como la inyección de Leptina o aCSF 4 min antes del estímulo con NaCN o solución salina no produjo cambios significativos en la expresión de C-fos en ningún grupo.

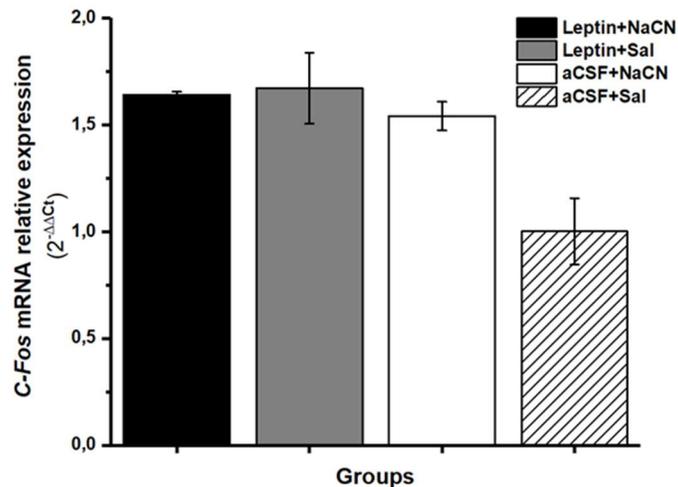


Fig. 3. Expresión relativa de receptores de ARNm de C-Fos en ratas con inyecciones de leptina o aCSF en NTSc antes de NaCN o solución salina en SCA. (medias \pm error estándar de la media) $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

En este artículo se muestra que la leptina en el NTSc precedida por un estímulo anóxico, como NaCN, en el SCA, aumenta la RGC y la expresión relativa del ARNm de Ob-Rb. Aunque el ARNm de C-fos no mostró un aumento significativo de la expresión relativa, todos los resultados indicaron que la leptina en el NTSc potencia la RGC inducida por un estímulo anóxico en los cuerpos carotídeos a través del aumento de los receptores Ob-Rb, sin aumentar los niveles de C-fos.

BIBLIOGRAFÍA

1. WG Haynes, DA Morgan et al. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100: 270-278.
2. SR Bornstein, K Uhlmann et al. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland. *Diabetes* 1997; 46: 1509-1511.
3. Mizuno, Y.; Oomura, Y. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 1984, 307, 109–116.
4. Frohman, L.A. CNS peptides and glucoregulation. *Annu Rev Physiol.* 1983, 45, 95–107
5. Wasserman AM, Ferreira M Jr., Sahibzada N, Hernandez YM, Gillis RA, 2002. GABA-mediated neurotransmission in the ventrolateral NTS plays a role in respiratory regulation in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 283 (6), R1423–R1441.
6. Alvarez-Buylla, R.; de Alvarez-Buylla, E. Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. *Resp Physiol* 1988, 72, 347-60.
7. Obeso, A.; Almaraz, L.; Gonzalez, C. Effects of 2-deoxy-d-glucose on in vitro cat carotid body. *Brain Res.* 1986, 371, 25-36.
8. Pardal, R.; López-Barneo, J. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci.* 2002, 5, 197-198.
9. Adachi, A.; Shimizu, N.; Oomura, Y.; Kobáshi, M. Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett*, 1984, 46, 215-218.

10. Housley, G.D.; Sinclair J.D. Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *J Physiol.* 1988, 406, 99-114.
11. Chen, I.L.; Weber, J.T.; Yates, R.D. Synaptic connections of central carotid sinus afferents in the nucleus of the tractus solitarius of the rat. II. Connections with substance P-immunoreactive neurons. *J Neurocytol.* 1994, 23, 313-22.
12. Hayes, M. R., Skibicka, K. P., Leichner, T. M., Guarnieri, D. J., DiLeone, R. J., Bence, K. K., & Grill, H. J. (2010). Endogenous Leptin Signaling in the Caudal Nucleus Tractus Solitarius and Area Postrema Is Required for Energy Balance Regulation. *Cell Metabolism*, 11(1), 77–83.
13. Ciriello, J.; Caverson, M.M. Carotid chemoreceptor afferent projections to leptin receptor containing neurons in nucleus of the solitary tract. *Peptides* 2014, 58, 30–35.
14. Denroche, H.C.; Huynh, F.K.; Kieffer, T.J. The role of leptin in glucose homeostasis. *J Diabetes Investig.* 2012, 3, 115–129.
15. Lemus, M.; Mojarro, C.; Montero, S.; Melnikov, V., Ramírez-Flores, M.; de Álvarez-Buylla, E.R. Leptin in the Commissural Nucleus Tractus Solitarii Increases the Glucose Responses to Carotid Chemoreceptors Activation by Cyanide. In: Gauda E. Monteiro M., Prabhakar N., Wyatt C., Schultz H. (eds) *Arterial Chemoreceptors. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Cham, 2018, vol 1071.
16. Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care from National Institutes of Health Guidelines, USA, 2010.
17. Cowan, A.; Lewis, J.W.; MacFarlane, I.R. Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *British Journal of Pharmacology*, 1977, 60, 537-45.
18. McNay, E.C.; Sherwin, R.S. From artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) to artificial extracellular fluid (aECF): microdialysis perfusate composition effects on in vivo brain ECF glucose measurements. *J Neurosci Methods.* 2004, 132, 35-43.
19. Paxinos, G.; and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York, 1986.
20. Yarkov, A.V.; Montero, S.; Lemus, M.; Rocas de Álvarez-Buylla, E.; Álvarez-Buylla, R. Arginine-vasopressin in nucleus of the tractus solitarius induces hyperglycemia and brain glucose retention. *Brain Res.* 2001, 902, 212-222.
21. Montero, S.A.; Yarkov, A.; Lemus, M.; de Alvarez-Buylla, E.R.; Alvarez-Buylla, R. Carotid chemoreceptor reflex modulation by arginine-vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius in rats. *Arch Med Res.* 2006, 37, 709-16.
22. Alvarez-Buylla, R.; Huberman, A.; Montero, S.; Lemus, M.; Valles, V.; de Alvarez-Buylla, E.R. Induction of brain glucose uptake by a factor secreted into cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 2003, 994, 124-133.
23. Lemus, M.; Montero, S.A.; Leal, C.A.; Portilla-de Buen, E.; Luquín, S.; García-Estrada, J.; et al. Nitric oxide infused in the solitary tract nucleus blocks brain glucose retention induced by carotid chemoreceptor stimulation. *Nitric Oxide.* 2011, 25, 387-95.
24. Waynfort, H.B.; Flecknell, P.A. (1994): *Ovariectomy in experimental and surgical technique in the rat*, Academic Press. 2nd ed. pp. 276–278.
25. Buyse, M.; Ovesjö, M-L.; Goïot, H.; Guilmeau, S.; Péranzi, G.; Moizo, L.; Walker, F.; Lewin, M.J.M.; Meister, B.; Bado, A. Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *European Journal of Neuroscience*, 2001, 14, 64-72,
26. Feng, X.; Shikama, Y.; Shichishima, T.; Noji, H.; Ikeda, K.; Ogawa, K.; et al. Impairment of FOS mRNA stabilization following translation arrest in granulocytes from myelodysplastic syndrome patients. *Plos One*, 2013, 8, e61107.
27. Du, H.; Shi, J.; Wang, M.; An, S.; Guo, X.; Wang, Z. Analyses of gene expression profiles in the rat dorsal horn of the spinal cord using RNA sequencing in chronic constriction injury rats. *J Neuroinflammation.* 2018, 15, 280.

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS RS670 Y RS5069 EN EL GEN *APOA1* CON CÁNCER DE MAMA EN POBLACIÓN MEXICANA DE OCCIDENTE.

Vargas-Obieta, Laura¹; Robles-Espinoza, Kiabeth¹; Gutiérrez-Rubio, Susan Andrea¹; Muñoz-Palomeque, Alejandrina¹; Rubio-Chávez, Lidia Ariadna¹; Rosales-Gómez, Roberto Carlos²

¹ Centro Universitario de Ciencias de la Salud ² Centro Universitario de Tonalá.

RESUMEN

La apolipoproteína A1 (ApoA-I) es el componente mayoritario del HDL, necesario para su ensamblaje y para el transporte de colesterol de los tejidos periféricos al hígado para catabolizarse. Además, se ha reportado que esta proteína tiene un papel en inflamación, crecimiento tumoral y metástasis en cáncer. Varios estudios han encontrado niveles séricos menores de ApoA-I en pacientes con cáncer. Entre los polimorfismos que presenta el gen *APOA1* existen una sustitución de una adenina por guanina localizada a -75 pb (rs670) y de una timina por citosina a +83 pb (rs5069) del gen *APOA1*. En un estudio realizado por Hamrita y col. en 295 pacientes con cáncer de mama y 197 controles de Túnez, se encontró una asociación en mujeres premenopáusicas portadoras del alelo A del polimorfismo rs670 y una asociación del alelo T del polimorfismo rs5069 que señala un riesgo mayor de recurrencia de metástasis gangliolar. En otra investigación realizada en China por Liu y col. en 216 pacientes con cáncer renal y 216 controles se encontró un riesgo una mayor susceptibilidad a cáncer renal para el genotipo AA y portadores del alelo A en el polimorfismo rs670.

El objetivo de la presente investigación fue analizar la asociación de los polimorfismos rs670 y rs5069 en el gen *APOA1* en mujeres mexicanas con cáncer de mama. Para este estudio se obtuvieron muestras de sangre periférica de 140 mujeres con cáncer de mama y 40 de población general, se extrajo el ADN por el método de sales de Miller y se realizó la técnica de PCR-RFLPs utilizando la enzima de restricción *MspI*, visualizándose mediante el uso de electroforesis con tinción en nitrato de plata. Se realizó conteo génico y prueba de Fisher y χ^2 . Se determinaron las frecuencias de los genotipos en los grupos de estudio. Dentro de los resultados obtenidos, para el polimorfismo rs670 en los alelos observados en los casos fueron GG 22.86%, GA 43.57%, AA 33.57% y para los controles GG 22.5%, GA 72.5%, AA 5%. Para el polimorfismo rs5069 los casos fueron CC 46.43%, CT 53.57%, TT 0% y para los controles CC 22.5%, CT 72.5%, TT 5%. Con base al análisis estadístico se encontró una asociación significativa de riesgo para presentar cáncer de mama de las personas portadoras del alelo A con OR de 1.766 (CI. 1.067-2.922, con $p=0.026$); y los homocigotos AA presentan un riesgo de 6.609 (CI. 1.339-32.627, con $p=0.01$) veces más de presentar cáncer de mama para el polimorfismo -75. Por otro lado, se encontró una asociación inversa para presentar cáncer de mama de los portadores del alelo T con OR de 0.521 (CI. 0.310-0.875 con $p=0.01$) y homocigotos TT con OR=0.029 (CI. 0.001-0.651, $P=0.0005$).

INTRODUCCION

Cancer de mama

El cáncer es un grupo de enfermedades que se puede desarrollar en algún tejido u órgano del cuerpo que se caracterizan por la pérdida de regulación del crecimiento y división celular. En esta enfermedad la célula sufre alteraciones en su ADN como mutaciones, rearrreglos y pérdida de la regulación por factores epigenéticos. El cáncer de mama es el tipo más diagnosticado en mujeres a nivel mundial, encontrándose en mayor proporción en países desarrollados pero con una mortalidad mayor en países en desarrollo debido a la falta de tratamientos eficaces y detección temprana [1].

El cáncer de mama representa el tipo de cáncer más frecuente en mujeres en el mundo [2]. En países en desarrollo este tipo de cáncer es la principal causa de muerte por tumor maligno mientras que en países en desarrollo se encuentra en segundo lugar después de cáncer de pulmón. En México, el cáncer ha representado el tipo de cáncer más común desde 2006 superando al cáncer cervicouterino [3].

Existen varios mecanismos mediante los cuales la enfermedad puede proliferar, entre ellos están: proliferación por activación de factores de crecimiento, evasión de supresores de crecimiento, evasión del sistema inmune, activación de mecanismos de inmortalidad, inflamación, metástasis,

angiogénesis, mutaciones del genoma, evasión a muerte celular y control del metabolismo energético [4].

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual contribuyen múltiples factores tanto genéticos como de estilo de vida. Entre los factores que se han descrito que incrementan el riesgo a padecer cáncer está tener algún familiar cercano de primer grado (hija, hermana, madre y aunque no es tan común padre o hermano), mutaciones en genes de alta penetrancia como *BRCA1* y *BRCA2*, factores reproductivos y hormonales que incrementan la cantidad de estrógenos como menopausia tardía (después de los 55 años), menarca temprana (antes de los 12 años), tener hijos a una edad avanzada (después de los 30 años); además el uso de anticonceptivos y terapias hormonales, algunas lesiones iniciales o benignas, radiaciones, no amamantar, entre otros. Otros factores que se han relacionado a cáncer son con respecto al estilo de vida de las personas como fumar, presentar obesidad o sobrepeso debido a que la producción de estrógenos después de la menopausia proviene de tejido adiposo [5,6].

Dentro de todos los casos de cáncer de mama solo una pequeña parte puede deberse a mutaciones de genes de alta penetrancia como *BRCA1* y *BRCA2* junto con otros genes de penetrancia intermedia, por su parte la otra proporción puede ser explicada por variantes de baja penetrancia [2].

Se ha relacionado el metabolismo de lípidos anormal con condiciones inflamatorias con algunos tipos de cáncer. Se necesita una mayor producción de colesterol en el proceso de proliferación de las células cancerígenas debido a que se necesita mantener los requerimientos metabólicos de estas. Por ello la célula cancerígena puede coordinar la activación del metabolismo de lípidos para la obtención de energía ATP por la vía de la beta oxidación de ácidos grasos, la formación de membranas, almacenamiento de energía y producción de moléculas de señalización. Una forma de medir el aumento de este metabolismo es mediante la cuantificación de sus productos como Apolipoproteína A-1 (Apo-A1) en suero [7].

Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas son proteínas que conforman las lipoproteínas, que son complejos moleculares capaces de transportar lípidos a través de la sangre como medio acuoso. Se denominan de acuerdo a una letra y un número desde A1 hasta M. Las lipoproteínas transportan principalmente colesterol no esterificado, colesterol esterificado, triglicéridos y fosfolípidos [8].

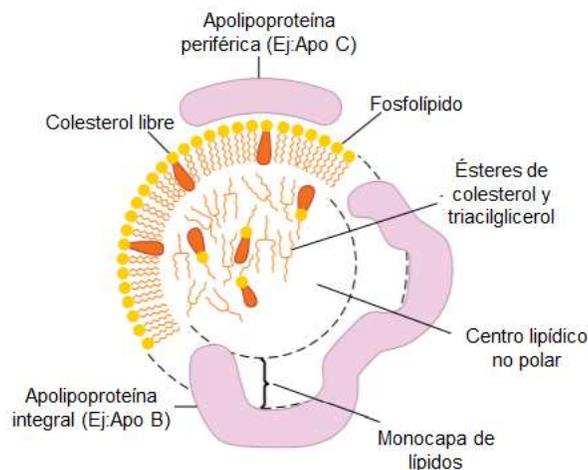


Figura 1. Estructura de las lipoproteínas [9]

El centro es no polar y consta de triacilglicerol y éster de colesterol rodeados de fosfolípidos anfipáticos y colesterol. Sus grupos polares se orientan hacia el medio acuoso. La porción proteica son las apolipoproteínas.

Con base en su densidad y composición las lipoproteínas se dividen en quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL, siendo las de mayor tamaño las de menor densidad y mayor contenido lipídico [8].

Apolipoproteína A1

La Apo-A1 es una proteína de 28 kD compuesta por 243 residuos de aminoácidos sintetizada por el hígado y el intestino. En su estructura secundaria está formada por hélices- α anfipáticas con uniones a prolina, la cual le da una amplia flexibilidad permitiéndole tomar diferente conformación en el HDL ya sea para formar una estructura discoide o esférica. La parte polar de la hélice está separada de la apolar por medio de residuos de lisina y arginina. La estructura anfipática de la proteína le permite interactuar con lípidos a través de su parte hidrofóbica y con la parte acuosa por su estructura hidrofílica [10].

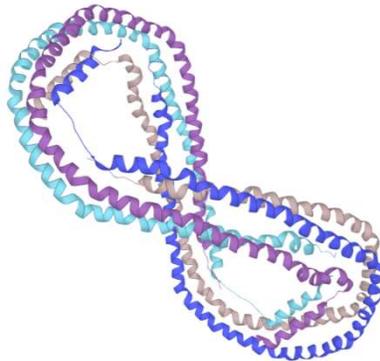


Figura 2. Estructura de ApoA-1 [11]

ApoA-1 es el componente proteico mayoritario que forma parte del HDL y es indispensable para su ensamblaje. ApoA-1 estabiliza el transportador ABCA1, en las membranas de hepatocitos y enterocitos permitiendo el flujo de fosfolípidos y colesterol libre al disco nascente de HDL, inicialmente libre de lípidos (pre- β 1 HDL). Un flujo similar se lleva a cabo desde los tejidos periféricos por medio de ABCA1 en el transporte reverso de colesterol. La ApoA-1 nascente activa la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) por medio de la cual se da la maduración del HDL esférico, produciendo ésteres de colesterol. La unión con el receptor ABCG1 contribuye al transporte reverso de colesterol, hasta que finalmente la unión con el receptor scavenger B1 (SR-B1) se transfiere el colesterol por medio de gradiente desde los tejidos hacia el hígado y es catabolizado y excretado por medio de la bilis [12,13].

Además de ser indispensable para el transporte de lípidos, ApoA-1 presenta propiedades antiinflamatorias. Los pacientes que presentan un estado de inflamación elevado presentan menores niveles de ApoA-1 en plasma, por lo cual se sugiere que juega un papel protector. ApoA-1 inhibe la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 (del inglés vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), E-selectina, y CD11b que intervienen en el proceso de diapédesis de las células inmunitarias [10].

Se ha visto que las células del sistema inmune tienden a infiltrarse en tejidos tumorales para su eliminación. La inflamación producida por células del sistema inmune puede contribuir al desarrollo de cáncer proporcionando un microambiente que favorezca el desarrollo de la célula tumoral como factores de crecimiento, activación de señales proliferativas, señales que favorecen metástasis y angiogénesis [4].

ApoA-1 es considerada como una molécula antioxidante ya que junto con la enzima PON-1 previene la peroxidación lipídica [10]. Los pacientes con cáncer de mama presentan niveles elevados de LDL oxidado (oxLDL) junto a una mayor expresión del receptor para oxLDL (OLR1) [14].

ApoA-1 también presenta una actividad antimicrobiana, además de una actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma brucei*. ApoA-1 se une y neutraliza el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA) de la pared de las bacterias Gram negativas y Gram positivas. La unión del HDL-LPS con el receptor SR-BI ocasiona una escasa activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4), un receptor tipo PAMP (Patrones moleculares asociados a patógenos) y disminuye los niveles de TNF, IL-1 β e IL-6 por células proinflamatorias [12].

En algunos estudios animales se ha relacionado ApoA-1 con la inhibición de crecimiento tumoral y progresión de metástasis en enfermedades [12].

Gen APOA1

El gen de APOA1 se encuentra junto con APOC3, APOA4 y APOA5 en un segmento de ADN ubicado en el cromosoma 11q23-24. El gen está formado por 4 exones que codifican inicialmente una cadena de 267 aminoácidos que posteriormente sufre una modificación a 243 aminoácidos liberada al plasma y sintetizada por el hígado y el intestino [13].

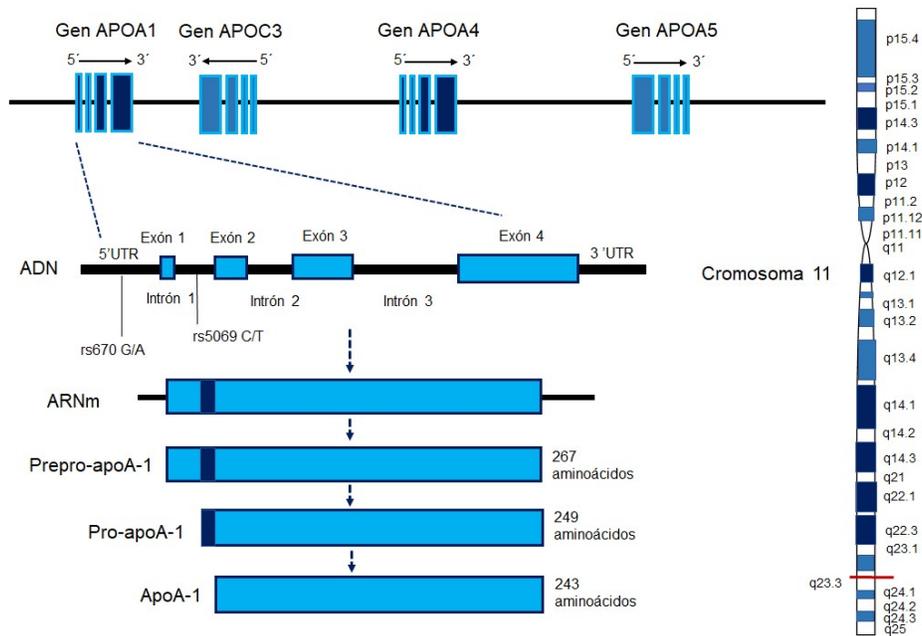


Figura 3. Localización del gen APOA1 y los polimorfismos rs670 conocido como -75 y rs5069 conocido como +83

A lo largo del genoma los polimorfismos pueden ocurrir en regiones del ADN no codificantes como las regiones reguladoras (promotores), los intrones y las regiones 5'UTR y 3'UTR, que se conservan en el ARNm pero no se traducen. Estos polimorfismos, aunque no afectan la secuencia de la proteína a codificar pueden afectar su expresión [15].

En el polimorfismo rs670 se lleva a cabo un cambio de G a A (-75) ubicado en la región promotora del gen APOA1, dando como resultado la eliminación del sitio de restricción para la enzima *MspI* (Wang et al., 1998). Se ha descrito que la sustitución puede incrementar la afinidad de un factor de transcripción positivo y aumentar la transcripción de APOA1 [16]

En el polimorfismo rs5069 (+83) existe un cambio de C por T ubicado en el intrón 1, y al igual que rs670 ocurre la eliminación de un sitio de restricción por *MspI*. Otro aspecto que se ha descrito para explicar la modificación de la eficiencia de la transcripción es que uno de los mecanismos para la regulación de la transcripción, la metilación de los islotes CpG, se ve afectado. Los sitios -75 bp o

+83bp se encuentran hipometilados para que el gen se exprese en tejidos como intestino e hígado, pero se encuentran metilados en células de tejidos que no lo expresan. Se ha relacionado que el cambio de base en esos sitios puede eliminar la citosina de metilación por lo que puede llevar a una hipometilación de este sitio, aumentando con ello la transcripción [17].

TEORIA

Se ha realizado un estudio en Túnez [18], donde se genotipificó el polimorfismo -75 en casos de cáncer de mama y controles. Se realizó una comparación con el tamaño del tumor, metástasis en vasos linfáticos y el grado histológico al momento de diagnosticarlo del expediente médico. Las frecuencias de los genotipos GG, GA y AA fueron: 70.6%, 25.9%, 3.6% para el grupo control y 60.3%, 26.9%, 2.7% para los pacientes. Se observó una baja prevalencia del alelo A, sin embargo, se encontró asociación con el desarrollo de cáncer, como se ve en la Tabla 1.

Se realizó otra investigación en China [19] respecto al polimorfismo -75 en pacientes con cáncer renal y se obtuvo información del grado y clasificación del tumor, invasión de ganglios linfáticos y metástasis. No hubo relación del grado y clasificación del tumor, estadio de invasión de ganglios. Se encontró una asociación del genotipo AA con estadio de metástasis como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios de -75 G/A relacionados a Cáncer

Tipo de Cáncer	Estudio	Resultados	Conclusión	Referencia
Cáncer de mama	Población de Túnez. 295 pacientes con cáncer de mama 197 controles	Asociación del genotipo GA con el riesgo de desarrollar cáncer (OR=1.66; P=0.012). Asociación entre los genotipos combinados GA+AA y el riesgo de cáncer de mama (OR=1.57; P=0.02) En mujeres premenopáusicas existe una asociación con el genotipo GA con o sin combinación con AA (OR=1.79 y 1.73)	Asociación de genotipos GA y AA con susceptibilidad a la enfermedad.	[18]
Cáncer renal	Población China 216 pacientes con cáncer renal 216 controles sanos	Los pacientes tuvieron una mayor frecuencia del genotipo AA (OR=2.10, 95% confianza CI=1.18,3.75; P=0.01) que los controles. Los pacientes en estatus de metástasis distante presentaron una frecuencia mayor del genotipo AA (OR=2.20, 95% CI=1.04,4.68; P=0.04).	Asociación de genotipo AA con estadio de metástasis distante y mayor frecuencia en pacientes con cáncer.	[19]

En el mismo estudio de Túnez las frecuencias observadas de los genotipos CC, CT y TT en el polimorfismo +83 fueron 95.4% 4.6% y 0% para el grupo control y 91.2%, 8.5% y 0.3% para los

pacientes con cáncer de mama. No hubo una asociación clínico-patológica de estado del tumor, ER, PR y grado histológico con el polimorfismo. Se sugiere que la presencia del genotipo CT predispone a un estadio más agresivo de la enfermedad [18].

No se encontró asociación del polimorfismo +83 con riesgo a cáncer renal en la investigación realizada en China [19] como se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Estudios de +83 C/T relacionados a Cáncer

Tipo de Cáncer	Estudio	Resultados	Conclusión	Referencia
Cáncer de mama	Población de Túnez. 295 pacientes con cáncer de mama 197 controles	Se encontró una asociación significativa de CT con extensión a nódulo linfático (OR=2.94; P=0.01).	Asociación de genotipo GT con extensión de la enfermedad	[18]
Cáncer renal	Población China 216 pacientes con cáncer renal 216 controles sanos	No se encontró asociación del polimorfismo con riesgo a cáncer renal.	No se encontró asociación del polimorfismo con riesgo a cáncer renal.	[19]

PARTE EXPERIMENTAL

Se tomaron muestras de sangre periférica de 140 pacientes con diagnóstico primario del Hospital de Ginecología y Obstetricia de Centro Médico y Clínica de Mama del Hospital Valentín Gómez Farías. Se obtuvieron 40 controles que acudieron al Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica. Para todos los casos y controles se obtuvieron previamente los consentimientos informados.

Se extrajo el ADN por la técnica de precipitación con sales de Miller. Posteriormente se realizó una PCR-RFLPs para la amplificación del fragmento de interés y una digestión con la enzima *MspI*. Se utilizaron los iniciadores APOA1-F CGAAGCTGATCCTTGAAGCTTAAG y APOA1-R ACACCTACCCGTCAGGAAGAG donde se programó el termociclador con 40 ciclos como sigue: 95°C 40 s, 64°C 40 s, 72°C 45 s.

Se realizaron las tipificaciones y se determinaron las frecuencias de los alelos para cada polimorfismo. Se comparó el grupo de estudio con el grupo de referencia mediante un análisis de Finnetti [20] en el programa OSSE (An Online Sample Size Estimator), con una confianza de 95% y un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En la electroforesis en gel de poliacrilamida cuando se encuentran presentes los alelos G y C el producto inicial de 433 pb termina cortado en 4 fragmentos. 209pb, 113pb, 66pb y 45pb. La presencia del alelo A hace que se formen solo 3 fragmentos 209pb, 179pb y 45 pb. La presencia del alelo T crea un solo fragmento de 254 pb en lugar de 2 fragmentos de 209 pb y 45 pb como se esperaría con el alelo C [18].

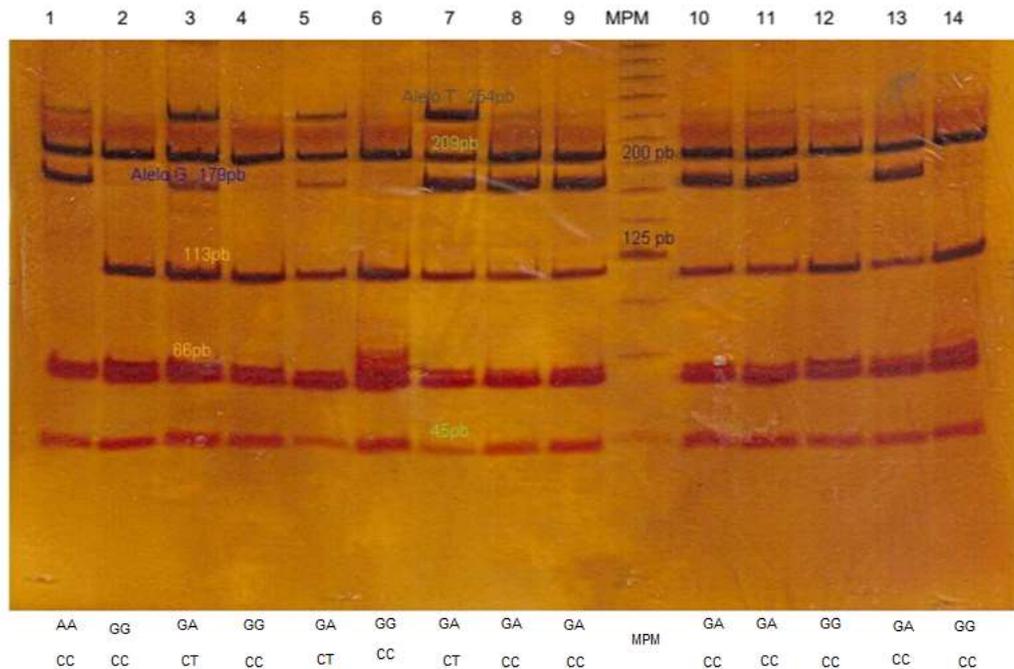


Figura 4. Genotipificación en gel de poliacrilamida

La presencia del alelo G en -75 forma dos bandas de 113 pb y 66 pb. La presencia del alelo A forma una única banda de 179 pb. La presencia del alelo C en +83 forma dos bandas de 209 pb y 45 pb. La presencia de T genera una banda de 254 pb. MPM: Marcador de peso molecular.

Para el polimorfismo rs670 en los alelos observados en los casos fueron GG 22.86%, GA 43.57%, AA 33.57% y para los controles GG 22.5%, GA 72.5%, AA 5%. Las frecuencias totales de cada alelo fueron para los casos 44.64% G y 55.36% A, para los controles las frecuencias del alelo A fueron menores con 41.25% y 58.75% para el alelo G.

Por su parte para el polimorfismo rs5069 los casos fueron CC 46.43%, CT 53.57%, TT 0% y para los controles CC 22.5%, CT 72.5%, TT 5%. Las frecuencias totales calculadas para cada alelo fueron en el grupo de estudio 73.21% C y 26.79% T; mientras que para el grupo control fueron de 58.75% y 41.25%.

De acuerdo al análisis de Finnetti mostrado en la tabla 3, se encontró una asociación de riesgo para presentar cáncer de mama significativa de las personas portadoras del alelo A con OR de 1.766 (CI.1.067-2.922, con $p=0.026$); y los homocigotos AA presentan un riesgo de 6.609 (CI. 1.339-32.627, con $p=0.01$) veces más de presentar cáncer de mama para el polimorfismo -75. Por otro lado, se encontró una asociación inversa para presentar cáncer de mama de los portadores del alelo T con OR de 0.521 (CI.0.310-0.875 con $p=0.01$) y homocigotos TT con OR=0.029 (CI. 0.001-0.651, $P=0.0005$).

La asociación del alelo A con riesgo a cáncer concuerdan con lo reportado con *Hamrita y col.* y *Liu y col* [18,19].

Tabla 3. Comparación de las frecuencias de los genotipos de -75 y +83 en pacientes con cáncer de mama y controles

Variante	Genotipo	Pacientes (n=140) Frecuencia	Controles (n=40)	OR	95% CI	P
APOA-1 (-75) G/A	GG	(32) 22.86%	(9) 22.5%	1	-	-
	GA	(61) 43.57%	(29) 72.5%	0.592	0.250-1.400	0.22966
	AA	(47) 33.57%	(2) 5%	6.609	1.339-32.627	0.01
	GA+AA	(108) 77.14%	(31) 77.5%	0.980	0.423-2.271	0.96212
	G	(125) 44.64%	(47) 58.75%	1	-	-
	A	(155) 55.36%	(33) 41.25%	1.766	1.067-2.922	0.02590
APOA-1 (+83) C/T	CC	(65) 46.43%	(9) 22.5%	1	-	-
	CT	(75) 53.57%	(29) 72.5%	0.521	0.310-0.875	0.013
	TT	(0) 0%	(2) 5%	0.029	0.001-0.651	0.0005
	CT+TT	(75) 53.57%	(31) 74.5%	0.335	0.149-0.755	0.007
	C	(205) 73.21%	(47) 58.75%	1	-	-
	T	(75) 26.79%	(33) 41.25%	0.521	0.310-0.875	0.01278

CONCLUSIONES

Se encontró en esta investigación que para el polimorfismo rs670 conocido como -75 las mujeres mexicanas de occidente portadoras del alelo A tienen 1.766 veces mayor a riesgo de presentar cáncer de mama. Asimismo, las mujeres que presentaron el genotipo AA presentan un riesgo de 6.606 veces mayor que una persona que no lo presenta. Se puede considerar el alelo A como un factor de riesgo en cáncer de mama.

Por su parte los resultados mostraron que el alelo T en el polimorfismo rs5069 conocido como +83 es un factor de protección en cáncer de mama en mujeres mexicanas de occidente.

BIBLIOGRAFIA

1. Brinton, L., Gaudet, M., Gierach, G. (2018). Breast Cancer. En Thun, M., Linet, M., Cerhan, J., Haiman, C., Schottenfeld, D., (Ed), Cancer epidemiology and prevention (pp.861-888) New York: Oxford University Press
2. Zavala, V. A., Serrano-Gomez, S. J., Dutil, J., & Fejerman, L. (2019). Genetic Epidemiology of Breast Cancer in Latin America. *Genes*, 10(2), 153. <https://doi.org/10.3390/genes10020153>
3. Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., Rodríguez-Cuevas, S. (2017). Clinical and pathological features of breast cancer in a population of Mexico. *Cirugía Y Cirujanos*, 85(3), 201-207. doi: 10.1016/j.circir.2016.08.004
4. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

5. Torre, L. A., Islami, F., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2017). Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 26(4), 444–457. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0858>
6. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., & Zhang, L. et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106. doi: 10.1016/j.gendis.2018.05.001
7. Ye, J., Luo, Q. Y., Wang, X. P., Liu, Z. Y., Chen, M. X., Huang, H., & Zhang, L. (2019). Serum Apolipoprotein A-I Combined With C-Reactive Protein Serves As A Novel Prognostic Stratification System For Colorectal Cancer. *Cancer management and research*, 11, 9265–9276. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S215599>
8. Erricoa, T. L., Chen, X., Martín-Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clínica e investigación en Arteriosclerosis*, 25(2). doi:10.1016/j.arteri.2013.05.003
9. Botham, K., Mayes, P., (2015). Transporte y almacenamiento de lípidos. En Rodwell, B., Bender, D., Botham, K., Kenelly, P., Weil, P. A., (Ed), Harper bioquímica ilustrada (pp 253-265) México DF: McGrawHill
10. Vuilleumier, N., Dayer, J. M., von Eckardstein, A., & Roux-Lombard, P. (2013). Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins?. *Swiss medical weekly*, 143, w13781. <https://doi.org/10.4414/smw.2013.13781>
11. UniProtKB. Consultado 04 de mayo del 2020 de: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02647>
12. Georgila, K., Vyrla, D., Drakos, E. (2019). Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Immunity, Inflammation and Cancer. *Cancers*, 11(8), 1097. doi: 10.3390/cancers11081097
13. Matsunaga, A. (Ed). (2014). Apolipoprotein A-I Mutations and Clinical Evaluation. Doi: 10.1016/B978-0-12-407867-3.00002-0.
14. Cedó, L., Reddy, S. T., Mato, E., Blanco-Vaca, F., & Escolà-Gil, J. C. (2019). HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development. *Journal of clinical medicine*, 8(6), 853. <https://doi.org/10.3390/jcm8060853>
15. Herráez, A. (2012). Diversidad del genoma: polimorfismos. En Texto ilustrado e interactivo, biología molecular e ingeniería genética. Elsevier. 405-429
16. Jeenah, M., Kessling, A., Miller, N., Humphries, S. (1990). G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and HDL-C. *Molecular biology & medicine*. 7. 233-41.
17. Wang, X. L., Badenhop, R. B., Sim, A. S., & Wilcken, D. E. (1998). The effect on transcription efficiency of the apolipoprotein AI gene of DNA variants at the 5' untranslated region. *International journal of clinical & laboratory research*, 28(4), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s005990050051>
18. Hamrita, B., Nasr, H., Gabbouj, S., Bouaouina, N., Chouchane, L., & Chahed, K. (2010). Apolipoprotein A1 -75 G/A and +83 C/T polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in breast cancer. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 1637-1643. doi: 10.1007/s11033-010-0274-0
19. Liu, Z., Xiao, Y., Tang, L., Jiang, L., Wang, Y., & Zhang, R. et al. (2015). Apolipoprotein A1 -75 G/A and +83 C/T polymorphisms and renal cancer risk. *Lipids In Health And Disease*, 14(1). doi: 10.1186/s12944-015-0132-0
20. Strom, T., Wienker, T. (2016). Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association.

ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* Y *GEOBACTER SULFURREDUCTENS*

Juana Elizabeth Alba Cuevas, Virginia Villa Cruz, Adriana Araceli Macías Reynoso y Héctor Pérez Ladrón de Guevara

Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Maestría en Ciencia y Tecnología con orientación en Nanotecnología y Materiales Avanzados. Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara.

elizabethalba97@gmail.com

RESUMEN

El crecimiento de una población bacteriana, se representa por la curva de crecimiento, de un cultivo microbiano, en un lapso de tiempo. La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: 1) fase de adaptación o "lag", 2) fase logarítmica o exponencial, 3) fase estacionaria y 4) fase de muerte. Esta curva de crecimiento se puede determinar mediante diversos métodos, que pueden ser directos e indirectos. Los métodos más comúnmente son turbidimetría y medida de la masa celular. Por lo que el presente trabajo tuvo la finalidad de monitorear el crecimiento de *Geobacter sulfurreducens* (ATCC 51573) y *Escherichia coli* (Strain K2, SIGMA), como modelo de estudio. Ambas cepas difieren principalmente por sus requerimientos de oxígeno. Además, se tiene especial interés en *Geobacter sulfurreducens*, debido a su capacidad de generar electricidad durante su metabolismo. Los microorganismos individualmente, presentaron comportamiento diferente en su crecimiento, lo que resulta en diferencias de sus parámetros cinéticos. *Escherichia coli*, presentó velocidades de crecimiento menor a lo presentado por *Geobacter sulfurreducens*, lo que indicó que *Escherichia coli* se reproduce más rápidamente que *Geobacter sulfurreducens*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias se encuentran entre las más abundantes formas de vida en la tierra. Están presentes en cada ecosistema y son vitales para la vida diaria. Debido a la importancia de las bacterias, desde su descubrimiento, ha sido de relevancia su estudio en los laboratorios de investigación. Para ello, las bacterias se cultivan bajo condiciones controladas en cultivo axénico (cultivo puro). Así, en cultivos de laboratorios, se ha observado que las bacterias crecen exponencialmente mostrando un comportamiento similar entre ellas que se representa con la "Curva de Crecimiento Microbiano". Esta curva de crecimiento microbiano muestra el incremento y declive poblacional de bacterias, considerando cuatro fases (adaptación, crecimiento exponencial, estacionaria y muerte). Cabe mencionar que el comportamiento de los microorganismos, durante las cuatro fases, está condicionado a varios factores pero principalmente al tipo y cantidad de nutrientes del medio de cultivo (Negroni, 2009; Granados, 2003).

En la práctica habitual del laboratorio, los experimentos se realizan siempre con poblaciones bacterianas, a menudo tomando muestras en diversos momentos de su crecimiento en un medio de cultivo, estas muestras se analizan por diversos métodos y se cuentan para llevar un registro del aumento de la población bacteriana esto en una curva de crecimiento microbiano. Las bacterias se reproducen por fisión binaria por lo que el registrar y analizar esta curva brinda información sobre el tiempo de duplicación (tiempo en que una célula se divide en dos) (analizando las dos primeras etapas ya que entre estas se tiene una relación lineal), velocidad de crecimiento, además de ofrecer una vista gráfica de las diversas etapas del crecimiento bacteriano tales como su adaptación al medio, su crecimiento, su estabilidad y cuando los nutrientes comienzan a agotarse provocando la caída de la curva.

Conocer y analizar las curvas de crecimiento de *E. Colli* y *G. Sulfurreducens* proporciona información sobre sus capacidades adaptativas y de crecimiento estando en las mismas condiciones ambientales cada una con su medio adecuado, brinda datos sobre la velocidad de crecimiento de ambas especies lo que nos permite hacer diversos comparativos en cuanto tiempos de duplicación y agotamiento de nutrientes, también es una fuente confiable de la viabilidad para sus usos posteriores en otros

experimentos en los que se necesiten conocer los datos que solo las curvas de crecimiento microbiano pueden ofrecer.

TEORÍA

Reproducción bacteriana se produce por fisión binaria, en la que una célula bacteriana se divide y se convierte en dos células. El tiempo necesario para la división celular se conoce como la generación de medio tiempo o tiempo de duplicación, que es el tiempo necesario para el número de células a doble. Cada división celular produce una duplicación del número de células. En un número bajo de células, el aumento no es muy grande; sin embargo, después de algunas generaciones, celular números aumento explosivo. Después de números divisiones, hay 2^n células.

Para entender y definir el crecimiento de microorganismos particulares, se colocan en un matraz, donde se controlan el suministro de nutrientes y condiciones ambientales. Si el medio líquido proporciona todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y parámetros ambientales propicios para el crecimiento, el aumento de números puede medirse como una función del tiempo para obtener una curva de crecimiento. Se observan varias fases de crecimiento distintas dentro de una curva de crecimiento. Se trata de la fase lag, la exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y la fase de muerte, cada uno de los cuales se asocian con cambios fisiológicos específicos.

En base al crecimiento exponencial del cultivo microbiano, se dice que la velocidad de incremento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número de bacterias presentes, con lo cual se obtienen ciertos parámetros de estudios, como el de la constate de velocidad de crecimiento k , que está estipulada como $k = n/t (\log(N) - \log(N_0)) / \log(2)(t-t_0) = k$, y el tiempo generacional g ($1/k=g$), que es el tiempo requerido para que todos los componentes bacterianos del cultivo aumenten en un factor de 2 (Villanueva, 1996).

En estas ecuaciones (de k o g) es necesario saber las concentraciones de las bacterias en distintos intervalos de tiempo, pudiendo estas obtenerse a través de técnicas como la turbidimetría, en la cual se mide la absorbancia de una suspensión dada (mide tanto células viables como no viables), la cual es función de la concentración de la sustancia (en este caso el microorganismo) en la muestra (Pickering, 1980).

La bacteria *Escherichia coli* fue inicialmente aislada y descrita por el pediatra alemán Escherich en 1885. Se caracteriza por ser un microorganismo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, poseer bacilos Gram negativos, no produce esporas, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce de acetofina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Su morfología consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. Su temperatura ronda entre 35-43 °C y la temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C. Sus condiciones de pH son entre 7.2 y 0.99.

E. coli presenta múltiples características y facetas, y constituye el taxón bacteriano mejor estudiado, aunque el conocimiento de las cepas salvajes es aún parcial.

Por otro lado, *Geobacter sp.* fue descubierto en 1987 en el sedimento de agua dulce del río Potomac en Washington por el doctor Derek Lovley. Las especies de *Geobacter* pertenecen a la familia Geobacteraceae, que se encuentra dentro de la dominio Bacteria, phylum *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria*, y orden *Desulfuromonadales*, son Gram-negativas, quimioorganótrofo anaerobio (Romero Mejía *et al.*, 2012).

La especie de *Geobacter* más estudiada *G. sulfurreducens* la estructura de *Geobacter*, indicando sus apéndices celulares, pili y flagelos. Los flagelos son estructuras proteicas, cuya función es permitir el desplazamiento de la bacteria por deslizamiento en su hábitat, evitando condiciones nocivas. Pueden ser uno o dos por célula, el tamaño es aproximadamente de 20 nm de diámetro por una longitud de hasta 16 μm . La presencia del flagelo es imprescindible en la búsqueda de Fe (III) y metales. Por otro lado, los Pili son estructuras eléctricamente conductoras de proteínas, cuya función es transferir electrones desde la superficie externa de *Geobacter sp.* hasta aquellos materiales que se logran reducir. Su número puede variar entre 100 y hasta 1000 por bacteria, su tamaño es aproximadamente de 3-5 nm de diámetro por 1-5 μm de longitud (Romero Mejía *et al.*, 2012).

Internamente, *Geobacter* posee una red de citocromos tipo C multihemo, con el fin de transferir los electrones desde una sustancia que es oxidada a otra que se reduce o acepta electrones; los citocromos c de la membrana externa y los pilis de las células conductoras ayudan a facilitar la transferencia directa de electrones (Romero Mejía et al., 2012), (Cornejo Martell, 2013).

Hay diferentes métodos para determinar el crecimiento de una población bacteriana, entre ellos se tienen métodos cualitativos como métodos cuantitativos. Entre los cualitativos esta el seguimiento del crecimiento bacteriano por medio de la densidad óptica, para esto se utiliza un espectroscopio y se mide la turbidimetría. Esta técnica mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida. Por otra parte, entre los métodos cuantitativos se utiliza el conteo de células el cual consiste en colocar una pequeña cantidad de suspensión bacteriana en una cámara de conteo y se coloca encima un cubreobjetos haciendo que haya una capa uniforme sobre la cámara, posteriormente se coloca en un microscopio o un contador electrónico y se realiza en contero por la geometría de la cámara. La cámara dividida en 25 cuadrados. El área de los 25 cuadrados es conocida, como también el volumen de muestra que esta área admite. Contando el número de bacterias presentes en los cuadrados (o algunos de ellos) se puede conocer cuánto hay en volumen conocido.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el proceso experimental la cepa de *E. coli* (O157:H7), fue re-suspendida y mantenida en Caldo nutritivo. Para la curva de crecimiento, matraces con el medio de cultivo (previamente esterilizado) fue inoculado con el 10%. Los matraces se incubaron a 37 °C. La medición del crecimiento se hizo de forma cualitativa y cuantitativa. El análisis cualitativo se hizo por turbidimetría a 570 nm en un espectrofotómetro UV-vis, marca Perkin Elmer, modelo LAMBDA 365 y el análisis cuantitativo se realizó con un Contador electrónico marca Corning Cell Counter. Para *G. Sulfurreducens* (ATCC 51573) se tomó como referencia lo citado por algunos autores (Lovley y col., 2011; Esteve Nuñez y col., 2005; Nevin y col., 2009)

RESULTADOS

Los resultados de la medición cualitativa y cuantitativa del crecimiento de *E. coli*, a 570 nm, se muestran en la Figura No. 1. En Figura No. 1, izquierda, se representa una curva de crecimiento típica de *E. coli*, en donde la relación de absorbancia con el tiempo es directamente proporcional, indicando esto que a mayor concentración celular, mayor densidad y mayor absorbancia. Las densidades ópticas obtenidas muestran el crecimiento de *E. coli* a partir de las 200 horas y una tendencia al incremento después de los 1000 minutos. Con respecto a la medición cuantitativa, Figura No. 1, derecha, también muestra un crecimiento del cultivo bacteriano a partir de los 500 minutos (5 horas) e incrementando conforme aumentó el tiempo. Estos resultados concuerdan con los reportado por Ugas (2018), en donde *E. coli*, bajo condiciones controladas de temperatura y pH, crece exponencialmente desde los 100 minutos de su cultivo, reflejándose hasta los 350 minutos y con tendencia al incremento conforme el tiempo de incubación.

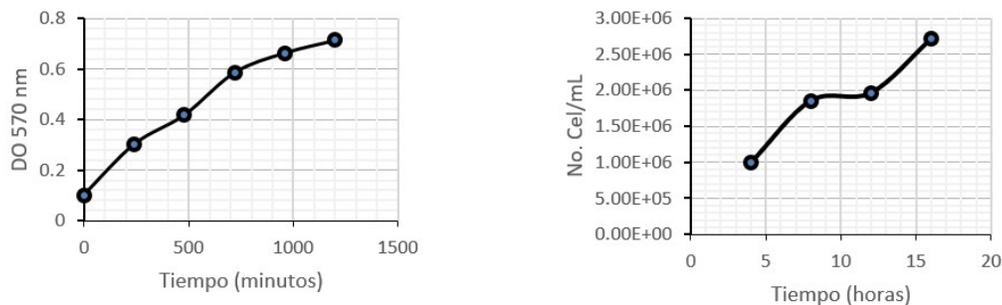


Figura 1. Medición cualitativo y cuantitativo del crecimiento de *E. coli*. (Figura izquierda, cualitativo; Figura derecha, cuantitativo)

El tiempo de generación que se obtuvo para *E. coli* fue de 23 minutos, Ugas (2018) reporta un tiempo de duplicación de 21 minutos. Esta diferencia entre los tiempos de duplicación puede estar relacionado a algunos factores como pH y temperatura, como lo menciona Ugas (2018). Por otra parte, López y col. (2016) mencionan que cambios genéticos en *E. coli*, aumenta el tiempo de incubación para el crecimiento exponencial de *E. coli*, lo que genera alteración en la cinética de crecimiento microbiano.

Con respecto a los tiempos de duplicación para *E. coli*, obtenidos experimental y teóricamente, resultan ser de menor tiempo, ya que para *G. Sulfurreducens* se reportan tiempos de duplicación de 6 a 8 horas (Lovley y col., 1998).

El crecimiento celular se considera como una reacción autocatalítica de primer orden, en donde en un sistema cerrado el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular. Un parámetro que se mide durante el crecimiento celular es el tiempo de duplicación, tiempo que se requiere para que una población de organismos se duplique en números. Así los tiempos de duplicación que comparamos muestran que la población de *E. coli*, aun con variantes en factores físicos, químicos o biológicos, se duplica más rápidamente que *G. Sulfurreducens*.

De forma general, el que un microorganismo requiera menor tiempo para duplicarse, puede representar una ventaja al incrementarse la biomasa rápidamente o una desventaja al generar un rápido consumo del sustrato. Por lo que, el tiempo de duplicación, no delimita el uso de un microorganismo, si no las condiciones de crecimiento del microorganismo, por lo que las condiciones de crecimiento de un microorganismo deben de ser óptimas.

CONCLUSIONES

En el laboratorio de uso, es necesario establecer las condiciones físicas, químicas y biológicas de los microorganismos de estudios para desarrollar y optimizar sus curvas de crecimiento microbiano. Esto permitirá el continuo trabajo de los microorganismos requeridos para experimentos específicos, como es el caso de *E. coli* y *Geobacter sulfurreducens*, ambas cepas son de importancia experimental en el laboratorio, para su empleo en Celdas de Combustible.

BIBLIOGRAFÍA

1. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2da edición. Buenos Aires: Edición Medica Panamericana S.A; 2009. p 656.
2. Granados P, Villaverde M. Microbiología. Madrid: Ediciones Paraninfo, S.A; 2003. p 352.
3. Pickering K. Química Analítica Moderna. Barcelona: Editorial Revete, S.A; 1980. p 688.
4. BROCK, Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. Décima edición. Madrid: Pearson; 2003. p 1111.
5. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S.A; 2007. p 959.
6. Cornejo Martell, A. J. (2013). *Estudio del microbioma presente en celdas de combustible microbianas*.
7. Jiménez-Escamilla, M. G., Garibay-Orijel, C., & Borja-Salín, M. A. (2018). Modelo bioquímicamente estructurado para la estimación de la eficiencia de una celda de combustible microbiana. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34(2), 331–345
8. Romero Mejía, A. A., Vásquez, J. A., & Lugo González, A. (2012). Bacterias, fuente de energía para el futuro. *Revista Tecnura*, 16(32), 117
9. Abraham Esteve-Núñez, Mary Rothermich, Manju Sharma and Derek Lovley. (2005). Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environmental Microbiology*, 7, 641–648.
10. Derek R. Lovley, Toshiyuki Ueki, Tian Zhang, Nikhil S. Malvankar, Pravin M. Shrestha, Kelly A. Flanagan, Muktak Aklujkar, Jessica E. Butler, Ludovic Giloteaux, Amelia-Elena Rotaru, Dawn E. Holmes, Ashley E. Franks, Roberto Orellana, Carla Risso and Kelly P. Nevin. (2011).

11. Nevin, K.P., Kim, B.C., Glaven, R.H., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Methe, B. A., Didonato, R.J., Covalla, S.F., Franks, A.E., Liu, A. and Lovley, D.R. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells.

REMEDIACIÓN DE AGUA DEBIDO A CONTAMINANTES DE PREOCUPACIÓN EMERGENTE POR VÍA ELECTROQUÍMICA CON IMPACTO A LA SALUD

Daniela Ramos Briseño, Maricela González Leal, Víctor Pérez Moreno, Miguel Ángel Rico Rodríguez, Miguel Ángel Rea López y Adrián Sosa Domínguez.

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA), 76010, Querétaro, México.

adrian.adrisodo@gmail.com

RESUMEN

El agua es un recurso natural que debe obligadamente ser preservada y remediada si el impacto humano ha causado su deterioro. Actualmente la utilización de procesos electroquímicos para diversos tratamientos del agua ha adquirido más importancia debido a su versatilidad, un tamaño reducido de sus elementos principales y su capacidad de automatización. La reacción más utilizada en este campo de estudio es la reacción tipo Fenton que tiene un interés particular gracias a que el proceso electroquímico-cinético es innovador y es un proceso en el que se colocan directamente los electrodos en contacto con el agua contaminada. Se requiere un proceso de tratamiento respetuoso al medio ambiente para la remediación de aguas que pueden contener contaminantes de preocupación emergente, tales como productos de cuidado personal, plaguicidas, drogas de abuso, hormonas, aditivos industriales, subproductos de la desinfección y fármacos. El término "contaminantes de preocupación emergente (CPE)" ha tomado atención debido al incremento de su presencia en el medio ambiente [1,2] dado lo anterior el objetivo del proyecto fue desarrollar un proceso para la remoción de ibuprofeno en agua por vía electroquímica. El ibuprofeno $C_{13}H_{18}O_2$ es un analgésico no esteroideo que se emplea para un alivio sintomático de la fiebre, cefalea, odontalgia y dolor muscular; tiene efectos similares a los de la aspirina y es de venta libre con ello otorga el fácil acceso a sus consumidores. Los resultados indicaron que al utilizar la tecnología electroquímica-cinética-Fenton, fue posible mejorar significativamente el rendimiento de degradación del ibuprofeno. En la investigación se utilizaron electrodos bimetálicos de hierro y aluminio los cuales fueron excelentes donadores de electrones y por lo tanto lograron un buen desempeño en la degradación del ibuprofeno. La presente investigación permitió llevar a cabo la remoción del ibuprofeno que es un buen inicio de conocimiento para la posterior aplicación de procesos de oxidación avanzada que permita la remoción de contaminantes en agua y suelo que son un riesgo para los consumidores de agua y de productos agrícolas con efectos significativos a la salud.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de remediación abarcan procesos bióticos; aquí los contaminantes son biotransformados en productos no nocivos por cometabolismo, cosustratos orgánicos y/o donantes de electrones. Es una degradación anaerobia y se apoya del uso de microorganismos. Se eliminan rápidamente compuestos orgánicos. Procesos abióticos en ellos se emplean oxidantes fuertes para reaccionar inmediatamente en el sistema. Por otro lado los sistemas físico-químicos requieren primero de conocer en qué parte están mayormente distribuidos los contaminantes, se emplea el coeficiente de partición de octanol-agua para conocer con exactitud dónde se encuentra el contaminante para establecer el sistema físico/químico a emplear. Los procesos microbianos se identifican por emplear in situ y emplear bacterias u otro tipo de microorganismo. Estas técnicas presentan desventajas desde el periodo de tiempo en que actúan para la eliminación del contaminante hasta las distintas etapas por las que pasa el agua o suelo para ser remediado.

Las técnicas electrocinéticas movilizan los contaminantes, son la base de la electroquímica para emplear los distintos métodos que emplean un menor tiempo de reacción para degradar el contaminante; llegan a tener una eficacia del 99% en la mayoría de los casos.

La utilización de electricidad para tratar aguas residuales tiene una larga tradición, siendo utilizada por primera vez en Inglaterra en 1889. La utilización de procesos electrolíticos en la recuperación de metales fue patentada por Elmore en 1904 y el proceso de electrocoagulación (EC) con aluminio y hierro fue patentado en Estados Unidos en 1909 [3]. Existen aplicaciones medioambientales en la

ingeniería electroquímica que contribuyen a una mayor sensibilización social hacia la restauración del medio sea cual sea la esfera ambiental en que se desarrolle el problema.

En general los procesos electroquímicos de remediación ambiental presentan grandes ventajas sobre las tecnologías no electroquímicas debido a que no se emplean reactivos químicos, dado que el electrón es el único "reactivo" intercambiado. Otra ventaja es que los procesos se desarrollan a presión atmosférica, así como a una temperatura cercana a la ambiental.

TEORÍA

Los procesos avanzados de oxidación (PAO) se han aplicado con éxito para la degradación de varios contaminantes farmacéuticos, como paracetamol, metoprolol, sulfacloropiridasina, omeprazol, amoxicilina, cloranfenicol, ranitidina y otros. El poder oxidante está determinado por el exceso de potencial del ánodo hacia la reacción de evolución de oxígeno y la entalpía de adsorción del radical hidroxilo electrogenerado. Los PAO son capaces de eliminar residuos farmacéuticos hasta la etapa de mineralización dependiendo de las condiciones de funcionamiento aplicadas. En general, los experimentos se realizan con una solución acuosa con concentraciones farmacéuticas superiores a las concentraciones medidas en efluentes reales. Hasta donde se conoce, no se ha estudiado el tratamiento electro-oxidativo en la fuente de aguas residuales hospitalarias reales en condiciones reales de concentración de productos farmacéuticos [4].

Un proceso de electrocinética acoplado a otro resulta ser innovador; por ejemplo el empleo de electrodos (inertes u oxidantes) que se incrustan de forma in situ o ex situ en el medio contaminado (agua/suelo) hablando de una de sus aplicaciones, con un gradiente de voltaje de baja corriente continua (CC) aplicado entre ellos. Un gradiente de potencial inicia el movimiento de contaminantes y reacciones electroquímicas. Electro-migración (los contaminantes se moverán con carga), electroósmosis (movimiento del fluido procesado), y electroforesis (movimiento mecánico de las partículas coloidales o microorganismos presentes en el medio de tratamiento) [5]. Actualmente se emplea una combinación de la electrocinética con otro proceso para un acoplamiento electrocinético, en algunos casos con nanopartículas. Esto para eliminar otros compuestos más como los hidrocarburos aromáticos policíclicos o metales pesados [6]. Otra tecnología aplicada es Electro-Fenton, en la cual se combina el proceso Fenton y la electrocinética, lo que ha mejorado la degradación de los contaminantes. Se ha reportado que mediante esta técnica se ha degradado 2,4 diclorofenol y pentaclorofenol [6].

Los procesos avanzados de oxidación (PAO), como la oxidación fotoquímica, la oxidación catalítica húmeda, la oxidación sonoquímica, la oxidación de O_3 , la oxidación electroquímica y la oxidación de Fenton, se han aplicado y desarrollado ampliamente para la mineralización directa de contaminantes orgánicos o la mejora de la biodegradabilidad de los contaminantes orgánicos a través de oxidación, estos son la base de los PAO. En una amplia comparación de los procesos de oxidación avanzada, el proceso de Fenton es el más popular debido a sus interesantes ventajas, como su amplio rango de aplicación, su fuerte capacidad anti-interferente, su operación simple y su rápida degradación y mineralización.

El desarrollo de procesos y tecnologías para la remediación simultánea de suelos y aguas contaminados por metales pesados y orgánicos se ha convertido en un área importante de investigación actual en el campo de la investigación de remediación de suelos. La mayoría de los estudios recientes sobre remediación de contaminantes en suelo han sido llevados a cabo de manera artificial, han tenido como objeto de estudio la eliminación de especies orgánicas o metales pesados. Es complicado evaluar la aplicación en campo, porque es difícil la remediación electrocinética para la eliminación de contaminantes hidrófobos y fuertemente absorbidos [7].

Los PAO se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios en la estructura química de los contaminantes, involucran la generación y uso de especies activas en el proceso, que sean fuertemente oxidantes principalmente el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Este radical posee una alta efectividad para la oxidación de materia orgánica principalmente en condiciones de temperatura y presión ambiente. Propiamente debido a la alta reactividad de esta especie es posible eliminar tanto compuestos inorgánicos como orgánicos disminuyendo así la demanda bioquímica de oxígeno y la cantidad orgánica total disuelta en aguas residuales tratadas.

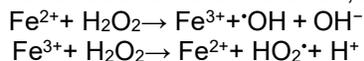
Estos procesos pueden acelerar la generación de radicales combinando con otros agentes oxidantes como el ozono, peróxido de hidrógeno, radiación UV, sales de hierro [Fe(II), Fe(III)] y otro tipo de catalizadores como dióxido de titanio.

Los PAO son aplicados principalmente como un tratamiento terciario, consisten en eliminar compuestos difícilmente biodegradables e incluso disminuir la contaminación microbiológica. Tienen la capacidad de oxidar una gran variedad de contaminantes logrando la mineralización del compuesto en tiempos prolongados o pueden quedarse en estados de oxidación intermedios que permiten un acoplamiento de otros métodos de depuración como pueden ser procesos biológicos. Los PAO se pueden clasificar según la participación de la luz en el proceso, como pueden ser fotoquímicos y no fotoquímicos. Los procesos no fotoquímicos originan especies muy reactivas a través de la transformación de especies químicas o mediante el uso de distintas formas de energía exceptuando la radiación luminosa. Un ejemplo puede ser la ozonización, el ozono se puede utilizar para la mineralización del contaminante, actúa disminuyendo el contenido de carbono orgánico total. Por otro lado en los fotoquímicos el empleo de la luz va desde la luz solar hasta la irradiación de luz pulsada, actúa como una fuerza impulsora detrás de la activación de un catalizador, el efecto es visible a una longitud de onda adecuada para trabajar sobre el contaminante. La luz ultravioleta es un ejemplo para este caso la irradiación va por debajo de los 190 nm y se utilizan lámparas de xenón. Aunado a lo anterior otros PAO más sencillos son la electro-oxidación u oxidación anódica (OA) se basan en la eliminación de los compuestos bajo la acción del ánodo en la celda electrolítica. En este proceso se puede trabajar a presión atmosférica, la velocidad de la reacción depende de la densidad de corriente aplicada, trabaja a temperaturas menores a 100° C. Aquí las variables que dependen para que el proceso sea eficiente son: electrolito soporte, pH del medio, temperatura, concentración del compuesto orgánico y el tipo de material anódico donde se llevaran a cabo las reacciones de oxidación. Mediante la selección adecuada de los electrodos y/o del electrolito se generan oxiradicales con un poder oxidante superior al de cualquier sustancia química oxidante, lo que permite la oxidación de la materia orgánica dando como productos CO₂ y H₂O.

A través de la oxidación química se cumple el propósito de mineralizar los contaminantes en dióxido de carbono, agua e inorgánicos. Los métodos basados en la destrucción química cuando se desarrollan adecuadamente, proporcionan una eliminación completa de los contaminantes mientras que aquellos que solo realizan separación de fases dejando un constante problema del residuo final. Los PAO requieren grandes cantidades de energía y electrodos metálicos de alto costo. Por lo tanto una selección del material semiconductor adecuado es esencial para el proceso [8,9].

La reacción de Fenton es uno de los PAO más utilizados y se ha estudiado ampliamente para su aplicación en el tratamiento de efluentes como un paso complementario. Es una reacción descrita en 1894 por el británico Henry Fenton.

En dicha reacción los iones Fe²⁺ actúan como catalizadores, y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como agente oxidante de la reacción, se produce el radical hidroxilo (•OH) estos radicales son altamente oxidantes, ayuda a mejorar el proceso de oxidación en un medio ácido (pH entre 2.5 y 3.0). Desde su descubrimiento, el reactivo Fenton es capaz de oxidar compuestos alifáticos y aromáticos halogenados, nitroaromáticos, colorantes azo, fenoles halogenados, formaldehído, herbicidas y hexadecano, entre otros. El radical hidroxilo también puede degradar compuestos orgánicos tóxicos y recalcitrantes empleando una serie de reacciones en solución, resumidas por la reacción [10].



Con el reactivo de Fenton se produce una descomposición pseudo-catalítica del peróxido de hidrógeno, con generación de radicales hidroxilo que pueden degradar al agente contaminante. Al abundar el hierro en el terreno la reacción de Fenton es casi siempre espontánea al introducir H₂O₂. El proceso de Fenton ha encontrado aplicaciones en el ámbito relacionado a aguas residuales, por ejemplo en la industria alimenticia; a escala piloto se utilizó la reacción Fenton para tratar aguas contaminadas con Tartrazina que es un colorante artificial usado en la industria alimenticia, método destacado por una eficiencia de remoción del 99% [11].

El mecanismo de oxidación para el proceso de Fenton se ha estudiado durante casi 90 años. Las investigaciones muestran que el proceso de Fenton incluye más de 20 reacciones químicas. La eficiencia de degradación de los contaminantes orgánicos en el proceso de Fenton depende de

parámetros operativos como el pH de las aguas residuales, la concentración de reactivo de Fenton y la concentración inicial de contaminantes orgánicos, de los cuales el pH de las aguas residuales es un parámetro muy importante [7].

El proceso convencional de Fenton se optimiza mediante un sistema heterogéneo, una teoría electroquímica y un principio fotocatalítico para formar tres tipos de procesos únicos de optimización de Fenton: proceso de Fenton heterogéneo, proceso de foto-Fenton y proceso de electro-Fenton [12].

Dentro de los PAO se emplea un método innovador, simple y seguro: un proceso electroquímico cinético. Se puede remediar una amplia gama de compuestos contaminantes como compuestos orgánicos, metales y contaminantes de preocupación emergente (CPE). El proceso es más efectivo que otros procesos como la electrocoagulación, peroxi-coagulación, electro-Fenton con respecto a la eliminación de color y DQO [13]. Consiste en usar electrodos que poseen una alta reactividad que producen más electrones libres a su vez generando más radicales libres y así dan como resultado, la degradación por oxidación química [14].

La oxidación electroquímica es de los PAO más aplicados para descomponer contaminantes del agua, estudios previos sobre la degradación de CPE utilizaron el proceso electroquímico cinético sugiriendo que estos compuestos se descompondrían más rápidamente e incluso se mineralizarían durante el tratamiento de oxidación. Sin embargo aún existen inconvenientes en el proceso tales como alto consumo de energía, electrodos inestables y el costo real sobre todo si es para el tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto los electrodos participantes deben elegirse cuidadosamente, mediante la consideración precisa de que deben tener la capacidad de atraer los electrones de los CPE en su superficie para iniciar la degradación y generar el radical OH^{\cdot} para reaccionar con los intermediarios.

Los PAO son necesarios en el tratamiento de los compuestos orgánicos incrustados; son de los procesos más interesantes y efectivos para el tratamiento de aguas contaminadas como se mencionaba para contaminantes orgánicos resistentes, incluyendo a los productos farmacéuticos [10].

Los contaminantes de preocupación emergente (CPE) o de cuidado personal (CCP) hacen referencia a cualquier producto empleado por las personas para el cuidado de la salud, mejora de la misma o por motivos cosméticos también a aquellos productos empleados para mejorar la calidad de áreas del cuerpo humano así como para aumentar el crecimiento de los animales o mejorar la salud de éstos. Diversos estudios han demostrado la presencia de contaminantes emergentes en cuerpos de agua; aguas residuales, ríos, aguas subterráneas, así como en suelos con riego de agua tratada para dicho uso. La presencia de productos farmacéuticos y de CCP en el medio acuático ha aumentado la preocupación en los últimos años [15].

Debido a su bioactividad y actividad farmacológica los productos farmacéuticos y de cuidado personal pueden representar una amenaza para la salud humana y el ecosistema una vez que son liberados de manera inadecuada. Los contaminantes emergentes, tienen un elevado potencial de ingresar al medio ambiente y de provocar efectos adversos sobre el sistema al que impactan o la salud de los organismos [16].

PARTE EXPERIMENTAL

La preparación de los electrodos con presencia de Fe y Al se llevó a cabo por el siguiente método. Los electrodos de aluminio primero se sumergieron en una solución diluida de ácido sulfúrico, posteriormente se sumergieron en una solución de cloruro férrico 1.7 M durante algunos segundos y se llevaron a un horno a 105°C durante 10 minutos para su secado. Luego se calcinaron a una temperatura de 500°C a 600°C durante 10 min. El procedimiento anterior se realizó por triplicado para verificar la estabilidad de la preparación.

Se dispuso de un electrodo fabricado como se describió anteriormente y un electrodo de acero inoxidable los cuales sirvieron como ánodo y cátodo respectivamente, estos electrodos se colocaron en un prototipo de celda electroquímica. Posteriormente se puso en la celda una solución de ibuprofeno de 100 mg/L. Las pruebas de degradación del ibuprofeno se realizaron aplicando un potencial de 2 V mediante una fuente de poder a un pH=3 durante 6 h. Posteriormente, se analizó

cada muestra de agua por triplicado por voltamperometría cíclica para realizar la cuantificación del ibuprofeno antes y después de aplicado el tratamiento de remediación.

Para llevar a cabo la cuantificación del ibuprofeno se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 20 mg/L a 100 mg/L. Posteriormente se analizó cada punto de la curva de calibración mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los voltamperogramas cíclicos del análisis de la curva de calibración de 20 mg/L a 100 mg/L. Se utilizó un electrolito soporte de buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.5.

Se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl (saturado KCl), un contraelectrodo de Pt y un electrodo de trabajo de carbón vítreo. Los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron con una ventana de potencial de 0 a 1.2 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

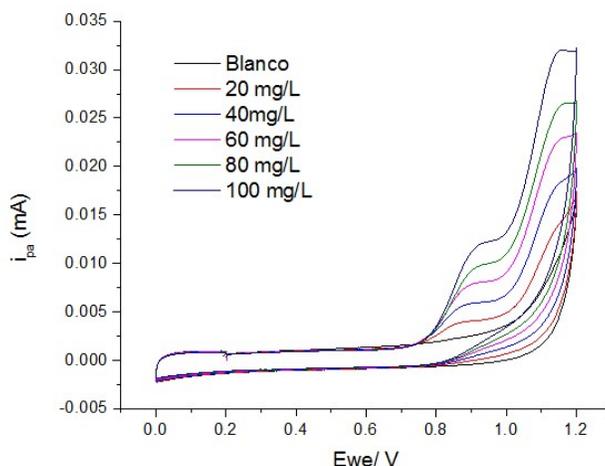


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos de la curva de calibración para ibuprofeno.

De los voltamperogramas cíclicos de la Figura 1 se obtuvieron los valores de corriente de pico anódica a cada concentración de ibuprofeno obteniéndose la curva de calibración que se muestra en la Figura 2.

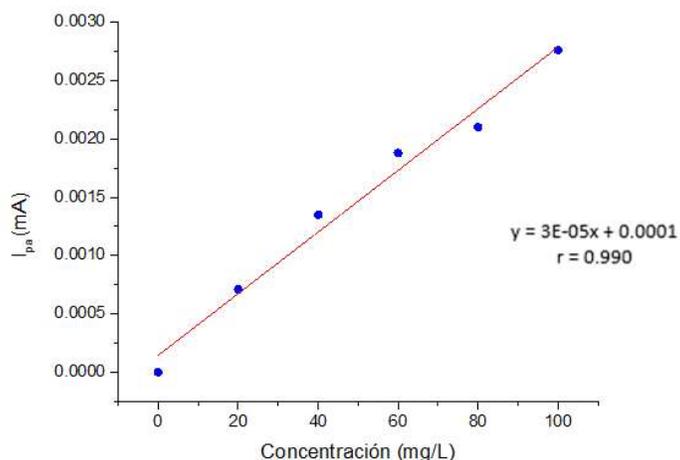


Figura 2. Curva de calibración para ibuprofeno.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros de validación para la metodología analítica para la detección y cuantificación de ibuprofeno.

Tabla 1. Parámetros de validación para la metodología de voltamperometría cíclica.

Límite de detección (mg/L)	26.9
Límite de cuantificación (mg/L)	44.8
r	0.99
Sensibilidad (mA L/mg)	3×10^{-5}
Coefficiente de variación	<0.8%

En la Figura 3 se muestra el prototipo de celda electroquímica utilizada para llevar a cabo el proceso de remediación de una muestra de agua con ibuprofeno en una concentración de 100 mg/L.

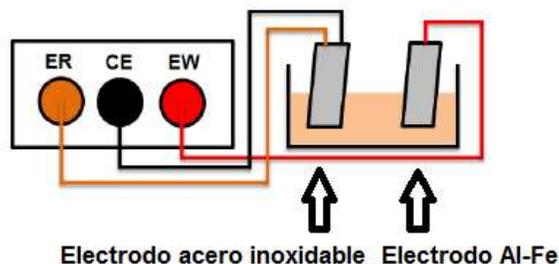


Figura 3. Prototipo de celda electroquímica utilizada para el proceso de remediación.

Una vez aplicado el potencial de 2 V por un tiempo de 6 horas se llevó a cabo la cuantificación de ibuprofeno después del proceso de remediación. La concentración inicial de la muestra de agua fue de 100 mg/L.

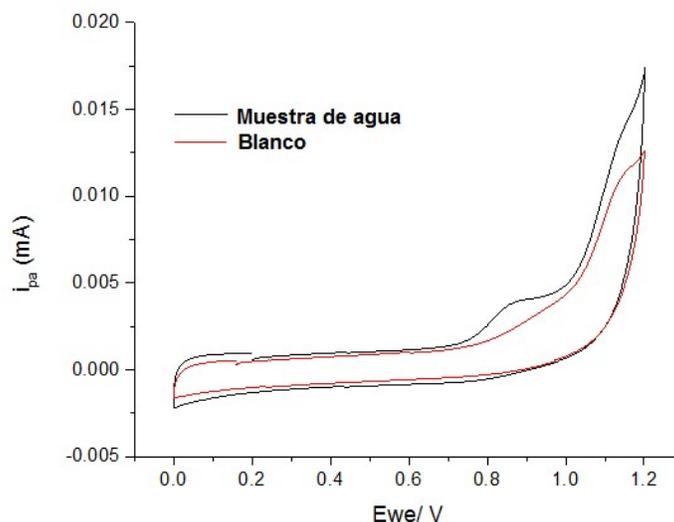


Figura 4. Voltamperograma cíclicos para cuantificar ibuprofeno después del proceso de remediación.

Tabla 2. Concentración antes y después de aplicar la remediación de la muestra de agua.

Concentración antes del proceso de remediación	Concentración después del proceso de remediación
100 mg/L	32.1 mg/L

CONCLUSIONES

Se logró implementar un método voltamperométrico para la detección y cuantificación de ibuprofeno con una sensibilidad de 3×10^{-5} mA L/mg. Después de llevar a cabo la implementación del método analítico para la cuantificación del ibuprofeno, se realizó el proceso de remediación de una muestra problema de agua con una concentración de ibuprofeno de 100 mg/L utilizando el prototipo de celda electroquímica con electrodos de Al-Fe y la aplicación de 2 V por 6 horas disminuyendo su concentración hasta 32.1 mg/L. Lo anterior muestra que el proceso de remediación fue efectivo para disminuir alrededor del 70% la presencia del contaminante de preocupación emergente como lo es el ibuprofeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. C. G. Daughton, T. A. Ternes, "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change", *Environ. Health Perspect.*, Vol. 107, 1999, pp. 907–938.
2. M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, "Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro River Basin (Northeast Spain)", *Environ. Chem.*, Vol. 26, 2007, pp. 1553–1562.
3. P. V. Nidheesh, R. Gandhimathi, Trends in electro-Fenton process for water and wastewater treatment: An overview. *Desalination*, Vol. 299, 2012, pp. 1–15.
4. Y. Ouarda, F. Bouchard, A. Azaïs, M. A. Vaudreuil, P. Drogui, R. D. Tyagi, R. Dubé, Electrochemical treatment of real hospital wastewaters and monitoring of pharmaceutical residues by using surrogate models. *J. Environ. Chem. Eng.* 2019, pp. 103-332.
5. C. H. Hung, C. Yuan, M. H. Wu, Y. C. Chang, Electrochemical degradation of ibuprofen-contaminated soils over Fe/Al oxidation electrodes. *Sci. Total Environ.* 2018, pp. 640-641.
6. K. R. Reddy, C. Cameselle, P. Ala, Integrated electrokinetic-soil flushing to remove mixed organic and metal contaminants. *J. Appl. Electrochem.* 2010, pp. 1269–1279.
7. M. Zhang, H. Dong, L. Zhao, D. Wang, D. Meng, A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective. *Sci. Total Environ.* 2019.
8. A. Fernández-Alba, D. Hernando, A. Agüera, J. Cáceres, S. Malato, Toxicity assays: A way for evaluating AOPs efficiency. *Water Res.* Vol. 36 (17), 2002, pp. 4255-4262.
9. M. Han, X. Duan, G. Cao, S. Zhu, S. Ho, Graphitic nitride-catalyzed advanced oxidation processes (AOPs) for landfill leachate treatment: A mini review. *Process Saf. Environ.* Vol. 139, 2020, pp. 230-240.
10. N. Klidi, F. Proietto, F. Vicari, A. Galia, S. Ammar, A. Gadri, O. Scialdone, Electrochemical treatment of paper mill wastewater by electro-Fenton process. *J. Electroanal. L. Chem.* Vol. 841, 2019, pp. 166-171.
11. G. Terán, P. Posligua, C. Banchón, Dosificación mínima del reactivo Fenton para la remediación de agua contaminada con colorantes. *UTE.* 2015, pp. 65–80.
12. F. L. Alférez, J. J. Olaya, J. H. Bautista, Síntesis y evaluación de resistencia a la corrosión de recubrimientos de $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2\text{-ZrO}_2\text{-BiO}_2$ sobre acero inoxidable 316L producidos por sol-gel. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* V. 2018, pp. 195–206.
13. F. Ghanbari, M. Moradi, A comparative study of electrocoagulation, electrochemical Fenton, electro-Fenton and peroxi-coagulation for decolorization of real textile wastewater: Electrical energy consumption and biodegradability improvement. *J. Environ. Chem. Eng.* 2015, pp. 499-506.
14. H. Chung-Hsuang, Y. Ching, W. Min-Hao, C. Yung-Chuan, Electrochemical degradation of ibuprofen-contaminated soils over Fe/Al oxidation electrodes. *Sci. Total Environ.* 2018, pp. 1205–1213.
15. X. Li, Y. Wang, S. Yuan, Z. Li, B. Wang, J. Huang, G. Yu, Degradation of the anti-inflammatory drug ibuprofen by electro-peroxone process. *Water Res.*, 2014, pp. 81–93.
16. S. Sauvé, M. Desrosiers, A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 2014, pp. 15-45.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS SOBRE CEPAS MULTIFARMACORRESISTENTES.

Angela Jaquelin Espinoza Mijangos, Catalina Rivas Morales, Ramiro Quintanilla Licea, David Gilberto Garcia Hernández y Catalina Leos Rivas

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
amijangos9802@gmail.com

RESUMEN

El uso desmedido de medicamento ha impactado de forma importante en la actualidad, esto debido a que las bacterias han desarrollado resistencia a los medicamentos, por lo que resulta indispensable la búsqueda de alternativas de ayuda en conjunto de los medicamentos, las plantas medicinales han ido ganando terreno ya que contienen compuestos con diferentes actividades biológicas, con las que se espera poder hacer frente a las bacterias. Se obtuvieron los extractos acuosos liofilizados de *Tecoma stans* (Tronadora), *Larrea tridentata* (Gobernadora), *Ibervillea sonora* (Wereke), *Gymnosperma glutinosum* (Jeringuilla) y *Olea europeae* (Olivo), los cuales fueron diluidos y posteriormente se realizaron diluciones seriadas con cada uno. Para la determinación de la actividad bactericida se utilizó la técnica de difusión en placa con la previa realización de los antibiogramas correspondientes para verificar la resistencia a antibióticos de las cepas de estudio. Se observó que el extracto de Jeringuilla sobre *S. aureus* muestra actividad en las concentraciones de 1000 y 500 PPM. A los extractos que mostraron mayor actividad, se les determinó su concentración mínima inhibitoria CMI en donde Jeringuilla demostró una CMI de 250 PPM. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el extracto acuoso liofilizado de Jeringuilla es una alternativa viable para el tratamiento contra las cepas resistentes evaluadas.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales en México se remonta a la medicina prehispánica, que se confronta con la medicina española a su llegada en 1521, por lo tanto, la medicina tradicional mexicana actual es resultado del encuentro de dos culturas.³ No solo las plantas han ido evolucionando a lo largo de la historia, sino también los microorganismos han ido desarrollando resistencia a antibióticos, misma que se define como la capacidad de un microorganismo de tolerar concentraciones de antibióticos clínicamente relevante.⁴ Los antibióticos son una categoría especial de fármacos antimicrobianos que sustentan la medicina moderna tal y como la conocemos: si pierden su eficacia, ello pondrá en riesgo el combate de enfermedades y procedimientos quirúrgicos fundamentales, como cesáreas, implantación de prótesis, quimioterapia contra el cáncer u otros tratamientos en humanos o animales. De manera natural, las bacterias y otros microorganismos, al enfrentar cambios evolutivos, pueden presentar modificaciones genéticas capaces de proporcionar nuevas habilidades o capacidades, incluyendo material genético o diferentes mecanismos que potencialmente confieren resistencia a los medicamentos antimicrobianos; estos nuevos rasgos se transmiten de manera vertical a la descendencia, o de manera horizontal incluso a otros microorganismos de diferentes especies.¹ El desarrollo de la resistencia a antibióticos en microorganismos sensibles y expuestos a antimicrobianos es inevitable. No obstante, este proceso se ha acelerado y expandido globalmente por la presión ejercida por exposición a contaminantes ambientales, uso de metales pesados, desinfectantes y antimicrobianos.⁴ Debido a esto, ha sido indispensable la búsqueda de alternativas de ayuda en conjunto de los medicamentos, a partir de lo cual las plantas medicinales han ido ganando terreno, ya que estas han sido ampliamente utilizadas desde hace cientos de años y en la actualidad el 80% de la población recurre a ellas como atención primaria. Las plantas medicinales presentan sustancias con diferentes capacidades con las que se espera poder hacer frente a las bacterias, sin embargo no solo se puede dejar en manos de estos compuestos el futuro de la población, la organización mundial de la salud ha dado a conocer su perspectiva 2030/2050 en la cual se espera que la mitad de la población morirá por razones relacionadas a bacterias multifarmacorresistentes, por otro lado también se verá afectada la economía, esto debido a que se

invertirá mucho dinero en la corrección de estas problemáticas, las cuales con la prevención adecuada se podrían disminuir.⁸

PARTE EXPERIMENTAL

Activación de las cepas

Las cepas se tomaron del cepario que se encuentra en conservación del laboratorio de química analítica, se preparó caldo nutritivo y se vertió un volumen de 4 ml en tubos de cristal, estos se tuvieron 24 h en la incubadora, como prueba de esterilidad, pasada la prueba se realizó la activación de las cepas, el procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar, con el flujo encendido, en cada uno de los tubos de caldo nutritivo mediante el uso de un asa bacteriológica, se realizó la siguiente metodología, se esteriliza el asa bacteriológica en el mechero, se tomó una asada del vial en conservación y se inoculó cada tubo, este proceso se repite con cada una de las cepas que se evaluarán. Se incubaron los tubos inoculados, por un periodo de 24 h a 36°C.²

Escalamiento McFarland

Posterior al tiempo de incubación se tomaron los tubos activados y se tomó su lectura a 600 nm buscando obtener una absorbancia inicial, entre 0.100 a 0.110, esta se obtuvo de la siguiente forma, dentro de la campana de flujo laminar, se tomó un tubo de cristal con caldo nutritivo, se agregaron 10 µl inicialmente a partir de los tubos activados hasta que se obtuvo la lectura de 0.100 a 0.110.²

Antibiograma

A partir de un tubo con el cultivo bacteriano previamente estandarizado en 0.5 de la escala de McFarland se sembró en una placa de agar Müller Hinton mediante extendido en placa con un asa Digrafsky, posteriormente se agregaron los discos Multibac ID de la casa comercial Investigación Diagnóstica con unas pinzas estériles en la placa, distribuyéndose alejados de los bordes y con espacio entre cada uno de los discos para evitar que los halos de inhibición no se vean superpuestos, por último se incubaron a 36°C por 24 h.²

Preparación de los extractos

A partir de las muestras liofilizadas obtenidas del laboratorio de fitoquímica, se pesaron 25 mg de liofilizado en un vial y se rotularon con el #4, posteriormente se agregaron 1 ml de agua destilada estéril y se agitó para integrar bien el extracto, posteriormente a tres viales más se les agregaron 500 µl de agua destilada estéril y se rotularon con los números 3, 2 y 1, finalmente se realizó una dilución seriada, a partir del vial #4 se tomaron 500 µl y se pasaron al 3 y así sucesivamente, en el caso de los últimos 500 µl sobrantes del tubo 1 se descartaron como desecho.²

Difusión en placa por pocillo

Para realizar la inoculación de las cajas Petri, se comenzó con un extendido en placa, mediante la toma de 100 µl de las cepas estandarizadas al tubo 0.5 de la escala de McFarland y se extendió con un asa digrafsky, posterior a eso, se realizaron 5 pocillos en el agar uno al centro, que será el control negativo que contendrá agua destilada estéril y los otros 4 alrededor con las diluciones de los extractos, de cada uno de estos se agregaron 25 µl en cada pocillo. Para concluir se llevaron a incubar a 36°C por 24 h para poder realizar el análisis de los resultados.²

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Este ensayo se realizó dentro de la campana de flujo laminar, en cajas de 96 pocillos, mediante los siguientes pasos, en los pocillos A1, B1, C1, E1, F1 y G1 se agregó el extracto a probar y posteriormente se agregó en todos ellos A, B, C, D, E, F y G hasta el número 6 medio Müller Hinton más rojo fenol, en los primeros 18 pocillos que van de la A1 hasta el A6, el B1 hasta el B6 y el C1 hasta el C6, se agregó la bacteria previamente estandarizada y en los 18 pocillos restantes que van de la E1 a la E6, la F1 hasta la F6 y la G1 a la G6, se agregó solamente agar Müller Hinton. Posteriormente en la fila A8, A9, B8, B9, C8 y C9 se agregó únicamente medio rojo fenol y las bacterias ya estandarizadas, en el caso de los pocillos E8, E9, F8, F9, G8 y G9 se agregó el Medio

rojo fenol y medio Müller Hilton, al terminar se llevó a un periodo de incubación 36°C por 24 h. Finalmente se buscó un cambio de coloración a rosa opaco en los pocillos inoculados con la bacteria (pocillos 1A – 6A, 1B – 6B Y 1C – 6C) en donde la presencia de esta coloración marcaba la falta de actividad del extracto.²

Pruebas cualitativas de determinación parcial de grupos funcionales

Alcaloides (Prueba de Dragendorff)

Se prepararon 2 soluciones A y B, se disolvieron .85g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua. Este reactivo se preparó mezclando 5 ml de la solución A y 4 ml de la solución B con 100 ml de agua. La prueba es considerada positiva al observar una coloración roja o naranja persistente por un periodo de 24 h.⁶

Flavonoide (Prueba del H₂SO₄)

Se disolvieron unos cuantos miligramos del extracto en H₂SO₄. Dependiendo de la coloración que se obtuvo se definió el contenido, amarillo para flavones, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.⁶

Prueba de Shinoda.

El extracto se disolvió en etanol y se puso en contacto con limaduras de Mg, se aplicó calor a la flama y posteriormente se agregaron unas gotas de HCl, esta prueba es considerada positiva si presenta coloraciones naranja, rojo, rosa, azul y violeta.⁶

Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet)

A 2 o 3 mg de la muestra se agregaron 3 a 4 gotas de la solución mezcla la cual consistió en una solución A que contenía ácido pícrico al 1 % en etanol y una solución B de NaOH al 10 %, se aceptó como un resultado positivo si se tornara de color naranja a roja oscura.⁶

Carbohidratos (Prueba de Molish)

A 1 o 2 mg del extracto se agregará gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), posteriormente se agregó 1 ml de ácido sulfúrico por las paredes, esta prueba será aceptada como positiva si se observaba un anillo púrpura en la interfase.⁶

Prueba de las cumarinas.

Se disolvieron 1 o 2 mg del extracto en NaOH al 10 %, se aceptó como resultado positivo si aparece una coloración amarilla y desaparece al acidular la prueba.⁶

Esteroles y triterpenos (Prueba de Liebermann-Buchard)

Se mezcló gota a gota 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, posteriormente se enfrió a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. Se aceptó como una prueba positiva si presentaba colores azul, verde, rojo, anaranjado.⁶

Prueba de Salkowski.

Se pondrá 1 a 2 mg en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, aceptándose como positiva si presentara colores amarillo o rojo para esteroles y metilesteroles.⁶

Oxidrilos fenólicos taninos vegetales (Prueba del FeCl₃)

Se disolvieron 1 a 2 mg del extracto en 1 ml de agua o etanol y se añadieron unas gotas de cloruro de fierro al 12.5 % en agua, se aceptó como un resultado positivo si presenta un precipitado rojo, azul-violeta o verde.⁶

Insaturaciones (Prueba del KMnO₄)

Se disolvieron 1 a 2 mg de la muestra en 1 ml de agua destilada, acetona o metanol y se añadió gota a gota una solución de KMnO₄ al 2 % en agua, se aceptó como positiva si se observó decoloración o formación de precipitado café.⁶

RESULTADOS

Antibiogramas

Se verifico la resistencia de las bacterias utilizadas por medio de antibiogramas, los resultados se muestran las figuras 1-3.

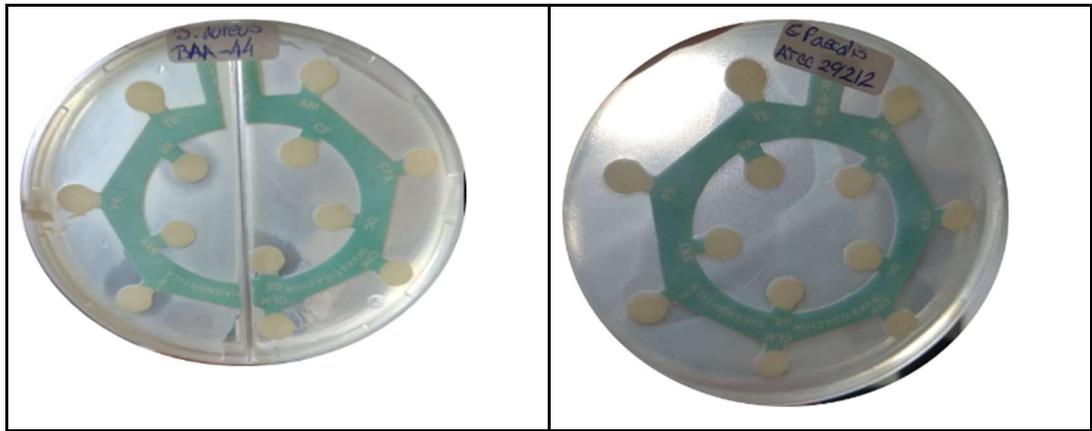


Figura 1. Antibiograma de *S. aureus* BAA-44 y *E. faecalis* 29212.

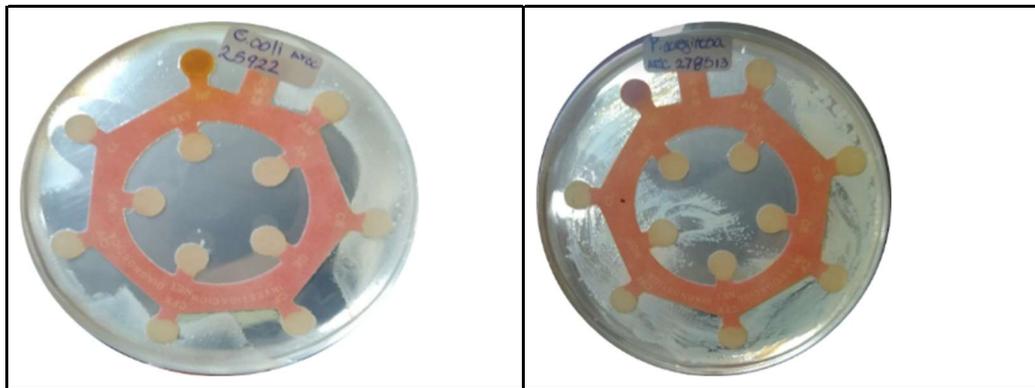


Figura 2. Antibiograma de *E. coli* 25922 y *P. aeruginosa* 27853.

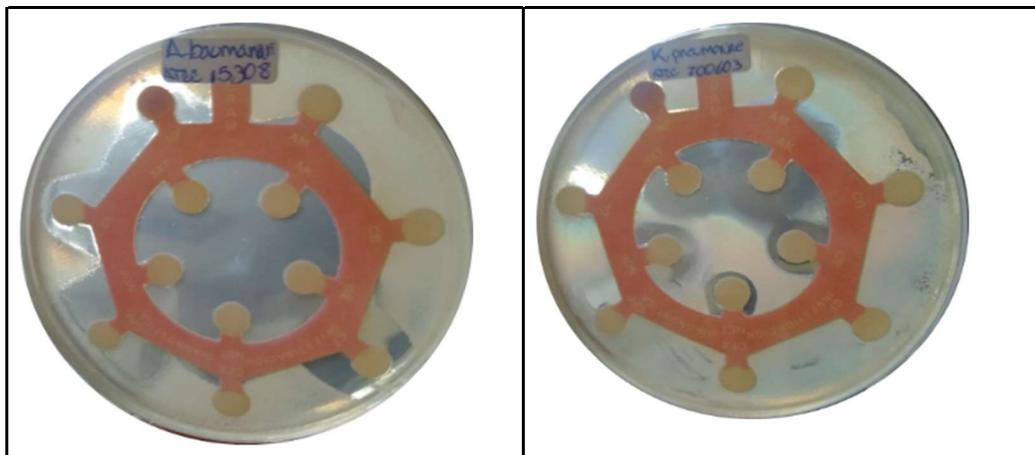


Figura 3. Antibiograma de *A. baumannii* 15308 y *K. pneumoniae* 700603.

Difusión en placa por pocillo

Se realizó la actividad bactericida por la técnica de pocillo, observándose actividad únicamente en la cepa de *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum*, con el extracto resuspendido a una concentración de 25 mg / ml (4) y en la primera dilución (3) se muestran los resultados en las figuras 4 y 5.



Figura 4. Difusión en pocillo de *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum*

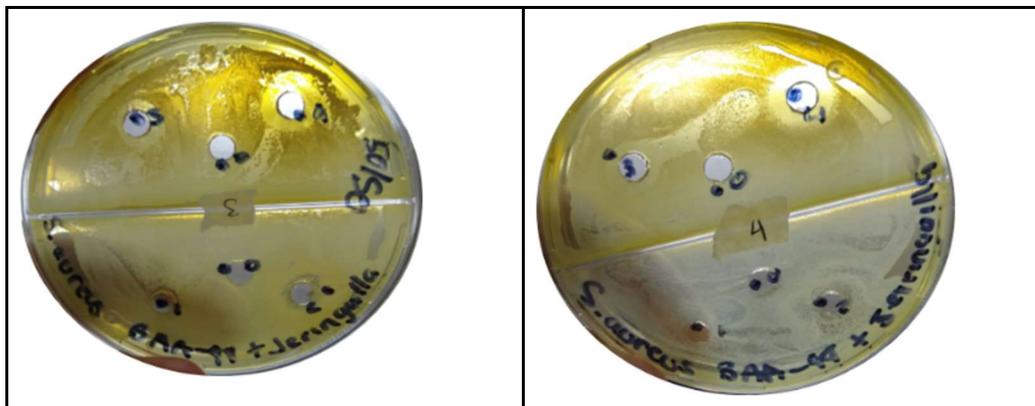


Figura 5. Difusión en pocillo de *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum*.

Se obtuvo un promedio de 6 mm y 9mm de halo de inhibición de los pocillos 3 y 4 respectivamente como se puede calcular con los datos de la tabla 1.

Tabla 1. Halos de inhibición presentes en *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum*

Tamaño del diámetro de los halos		
# de caja	Pocillo #3	Pocillo #4
1	6mm	10 mm
2	6mm	8mm
3	4 mm	8mm
4	8 mm	10 mm

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

A partir de la observación de la microplaca se observó que la CMI de *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum* es de 250 ppm como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* BAA-44 con el extracto de *G. glutinosum*.

Pruebas cualitativas de determinación parcial de grupos funcionales

Los resultados de las pruebas cualitativas de determinación parcial de grupos funcionales del extracto acuoso de *G. glutinosum* se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas cualitativas de determinación parcial de grupos funcionales del extracto acuoso de *G. glutinosum*.

Prueba química	Actividad
Lieberman Buchard	-
Cumarinas	+
Quinonas	+
Baljet	-
Saponinas	-
Antronas	+
Shinoda	+
Taninos	+
Dragendorff	-

DISCUSIÓN

Para el presente trabajo se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos liofilizados de *Tecoma stans* (Tronadora), *Larrea tridentata* (Gobernadora), *Ibervillea sonora* (Wereke), *Gymnosperma glutinosum* (Jeringuilla) y *Olea europeae* (Olivo), los cuales se obtuvieron a partir de plantas endémicas de México, esto debido a su uso común como medicina tradicional. Inicialmente se partió de un antibiograma para establecer con exactitud las resistencias adquiridas por las bacterias Gram + (*E. faecalis* y *S. aureus*) y Gram - (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*) a evaluar, mediante los resultados obtenidos, se realizó la prueba de la actividad de los extractos frente a las bacterias multifarmacorresistentes mediante la técnica de difusión en placa por pocillo, a partir de lo cual se observó un único resultado con actividad positiva, siendo este el caso del extracto de *G. glutinosum* en presencia de la cepa de *S. aureus* BAA-44 de igual forma Hernández y colaboradores⁹ han reportado con anterioridad la actividad presentada por el extracto *G. glutinosum*, donde se observa que éste presenta actividad antimicrobiana al realizarse las pruebas de este extracto mediante solventes como hexano y metanol sin embargo la actividad reportada mediante este tipo de extractos presentaban un amplio espectro de actividad en comparación al extracto acuoso utilizado, esto debido a dos variables como lo son el uso de bacterias multifarmacorresistentes y por otra parte el solvente utilizado, el cual le confiere características diferentes a los extractos ya reportados. De igual forma García⁶ reporta un extracto mediante solvente etanólico de *G. glutinosum* con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* 25923 respaldando así la presencia de actividad antimicrobiana en extractos procedentes de *G. glutinosum*. Por consiguiente, mediante el descarte de los extractos, se procedió a buscar la CMI para la obtención de una dosificación más específica, en este caso el rango mínimo obtenido fue aproximadamente de 250 ppm a partir de lo cual se empezaba a observar una actividad inhibitoria en el uso del extracto de *G. glutinosum*, en comparación con la CMI de 31.25 ppm reportada por García⁶ a partir del extracto etanólico de *G. glutinosum* en presencia de *S. aureus* 25923 se pueden comparar las dosis anteriores, observándose una diferencia significativamente mayor la del extracto acuoso liofilizado frente al extracto etanólico, sin embargo la bacteria utilizada en los extractos acuosos, presenta multifarmacorresistencia, a partir de lo cual se puede observar la alta efectividad que confiere la obtención de un extracto acuoso liofilizado frente a un extracto etanólico, sin mencionar que para la resuspensión del extracto acuoso, no es necesario el uso de solventes más

que el uso de agua destilada la cual es inerte, entendiéndose así la falta de una actividad adicional al extracto mismo a partir del solvente.

De igual manera al contrastar estos resultados con las dosis reportadas por Mensa y colaboradores¹⁰ con relación a las dosificaciones necesarias en el control de *S. aureus*, donde los rangos iniciales de acción que se establece son de 500 miligramos, en el caso de una dosificación mixta se observa que son de 200 mg del antibiótico principal + 100 mg del antibiótico de ayuda, permitiendo observar que el rango mínimo de acción obtenido se encuentra dentro de los rangos aceptables de actividad.

Por otra parte, con relación a la vida media del extracto se logró observar que una vez resuspendido este presentaba actividad hasta un promedio de 40 días posteriores, mientras que en comparación con la ficha técnica de uno de los principales antibióticos utilizados contra infecciones provocadas por *S. aureus* como lo es la amoxicilina, solo se reporta una vida efectiva hasta 14 días posteriores a su resuspensión.¹¹

Como último ensayo se realizaron pruebas fitoquímicas para observar qué componentes conforman y dan las características activas del extracto, a partir de los resultados obtenidos se observó que el extracto se conformaba por metabolitos secundarios como carbohidratos, quinonas, antrona, flavonoides y taninos de los cuales se ha reportado la presencia de flavonoides, en extractos metanólicos diterpenos mediante extractos hexánicos.⁷

En el caso de la relación entre estos metabolitos y su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* se tiene reportado por Compean & Ynalvez⁵ que existen flavonoides, taninos y quinonas que confieren la actividad antimicrobiana específica contra esta cepa.

CONCLUSION

Mediante la evaluación de las cepas Gram + (*E. faecalis* y *S. aureus*) y Gram - (*P. aereginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*) con los extractos acuosos liofilizados de *Tecoma stans* (Tronadora), *Larrea tridentata* (Gobernadora), *Ibervillea sonora* (Wereke), *Gymnosperma glutinosum* (Jeringuilla) y *Olea europaea* (Olivo) se encontró que el extracto de *G. glutinosum* presenta actividad antimicrobiana contra la bacteria multifarmacorresistentes *S. aureus* B-44 con una concentración mínima inhibitoria considerablemente baja de 250 ppm para ser usada como un coadyuvante en el tratamiento de enfermedades con estas cepas resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuerdo de 2008 [Diario Oficial de la Federación]. Por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. 5 de junio de 2018.
2. Betrán A., Cortés A. y López C. (2015). Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Rev Esp Quimioter*, 28(5), 263,264.
3. Can, G., Aguilar, W. Y Ruenes, R. (2017). Médicos tradicionales mayas y el uso de plantas medicinales, un conocimiento cultural que continúa vigente en el municipio de Tzucacab, Yucatán, México. *Teoría y Praxis*, 27, 67-89.
4. Celis, Y., Rubio, V. Y Camacho, M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 19(2), 105-117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501>
5. Compean, K. & Ynalvez, R. (2014). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de plantas: Una revisión. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8(5), 204-213. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>
6. García Hernández, David Gilberto. (2009). Actividad bactericida de los extractos etanólicos : de *Heliopsis longipes*, *Cecropia obtusifolia* y *Gymnosperma glutinosum*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León]. CODICE - Universidad Autónoma de Nuevo León.
7. Gomez-Flores, R., Espinosa-Ramos, D., Quintanilla-Licea, R., Barrón-Gonzalez, M., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. & Rodriguez-Padilla, C. (2016). Actividad antimicrobiana de

- Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) menos. (*Asteraceae*) extractos de metanol contra *Helicobacter pylori*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 13(4), 55-59. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.9>
8. Grupo de Coordinación Interagencial sobre Resistencia Antimicrobiana (2019). No podemos esperar: asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. Estudios de la Organización Mundial de la Salud, Editorial ONU.
 9. Hernández, T., García-Bores A., Serrano R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C. & Lira, R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. TIP Rev Esp Cienc Quim Biol, 18(2),116-121. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.003>
 10. Mensa, J., Soariano, A., Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda, E., Moreno, A., Pasquau, J., Gómez, J., Parra, J., Candel, J., Azanza, J., García, J., Marco, F., Soy, D., Grau, S., Arias, J.,... GTIPO-Sociedad Española de Anestesiología y Reanimación. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter, 26(Suppl. 1), 1-84.
 11. Sandoz Farmacéutica S.A. (1998). Ficha técnica: Amoxicilina. Centro Empresarial Osa Mayor, Madrid, España.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO Y SENCILLO PARA LA DETERMINACIÓN DE LEVETIRACETAM MEDIANTE HPLC-UV

Yessica Zapata Vázquez¹, Martha Guadalupe Sosa Macías², Marisol Galván Valencia¹, Carlos Galaviz Hernández², Blanca Patricia Lazalde Ramos¹

¹Maestría en Ciencia y Tecnología Química, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, ²Laboratorio de Biología Molecular, CIIDIR-IPN Unidad Durango.

zvqzyesi@gmail.com.

RESUMEN

El levetiracetam con nombre químico y fórmula son (S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidona acetamida y $C_8H_{14}N_2O_2$ es un fármaco antiepiléptico derivado de la pirrolidona de segunda generación, tiene un peso molecular de 170.21 g/mol, es muy soluble en agua, parcialmente soluble en metanol y etanol e insoluble en solventes no polares como el hexano. Fue aprobado por la FDA en 1999 y es considerado farmacológicamente seguro. Diversos métodos analíticos han sido reportados para su análisis en fluidos biológicos, tales como; inmunoensayo, espectrometría de masas, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta precisión. Se validó el método analítico por HPLC/UV para la cuantificación sérica de levetiracetam, bajo lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013. Para la validación se utilizó captopril como estándar interno y una columna fase reversa C18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm), los analitos se extrajeron mediante extracción líquido-líquido con diclorometano, se utilizó un detector ultravioleta y el rango de detección se determinó entre 5 y 105 μ g/ml. Las condiciones cromatográficas fueron fase móvil ácido fosfórico 0.43%: acetonitrilo (90:10), pH 6.8, longitud de onda de 231 nm, flujo de 1.5 mL/min, volumen de inyección de 15 μ l, tiempo de corrida de 8 min, tiempos de retención de 1.56 ± 0.07 min para captopril y 3.9 ± 0.125 min para levetiracetam. El coeficiente de correlación para el metabolito fue mayor a 0.99, el coeficiente de variación tanto para reproducibilidad como repetitividad fue menor al 15%, se mantuvo una desviación estándar <15% para la exactitud y el recobro fue de 89%. Los analitos fueron estables durante 24h a temperatura ambiente y 1 mes en congelación, presentando degradación después de 72 h en el automuestreador y tras ser sometido a tres ciclos de congelación y descongelación. La sensibilidad del método se determinó mediante el límite de cuantificación y el límite de detección. El límite de cuantificación fue de 5 μ g/mL para el analito, con un coeficiente de variación de 11.88 %. Se evaluó la selectividad para encontrar posibles interferencias en la concentración más baja de la curva de calibración como son compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante, donde no se encontró ningún tipo de interferencia en los tiempos de retención de los analitos. El método validado presentó exactitud, precisión, linealidad y reproducibilidad, por lo cual, el método puede ser utilizado en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia de productos que contengan Levetiracetam como principio activo.

INTRODUCCIÓN

Existen múltiples fármacos utilizados en la práctica clínica, principalmente fármacos con una estrecha ventana terapéutica, que requieren monitoreo en circulación sanguínea para ajustar su dosificación con el propósito de mejorar su efectividad con el menor riesgo de toxicidad (Leandro *et al.*, 2013)

Entre estos medicamentos se encuentran los digitales, la teofilina, el metotrexato, algunos antimicrobianos y los antiepilépticos (Perez *et al.*, 2002). Entre los fármacos antiepilépticos de segunda generación se encuentra el levetiracetam (LEV).

El LEV se utiliza principalmente en el tratamiento de epilepsias parciales, en el un rango terapéutico de 12 a 46 μ g / ml (Krasowski *et al.*, 2010), presenta una absorción intestinal rápida (>90%), sin embargo, su actividad farmacológica disminuye con los alimentos sin modifican su absorción total, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en el rango de 0.6 - 1.3 h con una biodisponibilidad cerca del 100% y un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 6 a 8 h (Tomson *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013).

LEV no es metabolizado extensamente, por lo que no participan las isoformas del citocromo P450 hepático. Su vía metabólica principal es la hidrólisis enzimática del grupo acetamida llevada a cabo en tejidos, incluyendo células sanguíneas. El metabolito principal es ucb L057 (24% de la dosis), el cual es inactivo farmacológicamente (Alrabiah *et al.*, 2019).

El volumen de distribución del LEV es de aproximadamente 0.5 a 0.7 L/kg, un valor cercano al volumen corporal de agua total. Al igual que otros antiepilépticos LEV cruza la barrera hematoencefálica y posee una buena penetración tisular sin acumularse en los tejidos. El promedio de depuración corporal total es de 0.96 ml/min/kg. Se excreta principalmente por vía renal (95% de la dosis), con una eliminación proporcional al aclaramiento de creatinina, por lo que $t_{1/2}$ se incrementa en casos de insuficiencia renal. Un porcentaje mínimo (0.3%) de la dosis es eliminada por vía fecal, es por lo que se debe dar una dosis personalizada a pacientes con insuficiencia renal (Santos Zambrano *et al.*, 2011; Tomson *et al.*, 2013).

Se puede monitorizar la concentración plasmática de los medicamentos con estrecha ventana terapéutica para asegurar su efectividad y evitar la toxicidad mediante su cuantificación por métodos analíticos.

Para que un método analítico pueda ser empleado para la cuantificación de muestras biológicas debe ser validado previamente en el sitio de análisis y cumplir con las características de desempeño establecidas en la normatividad vigente (linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y sensibilidad), y así establecer la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Por lo cual, el objetivo del estudio fue validar un método analítico por HPLC/UV simple, rápido y preciso para la cuantificación sérica de levetiracetam, bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

TEORÍA

Diversos métodos han sido reportados para la cuantificación de LEV en diversos fluidos biológicos, como es el caso de espectrometría de masas, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) En la tabla 1 se engloban los métodos analíticos reportados para la cuantificación de LEV en fluidos biológicos.

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de LEV

R	Met.	Columna	Flujo (mL/min)	Fase móvil	TR (min)	λ (nm)	SI	S ($\mu\text{g/mL}$)	Fluido
20	HPLC UV	FR C8 5 μm , 250 x 4,6 mm.	1.2	H ₃ PO ₄ 5%: ACN (90:10 v/v).	5.2	205	Captopril	5 -105	Suero
17	HPLC UV	FR 5 μm 150 mm x 4.6 mm	1	H ₃ PO ₄ : ACN	6.8	205	S.D	1- 75	Plasma
5	HPLC UV	FR 150 mm x 4.6 mm.	1.5	K ₂ HPO ₄ : ACN (94: 6 v/v).	7.3	205	UCB 17025	4- 80	Plasma
13	HPLC UV	FR 50- x 2.0 mm (5 μm .)	0.5	Metanol: Agua	3.5	220	UCB 17025	5 -150 pg/mL	Plasma
4	HPLC UV	Synergi 4 μm Hydro-RP, 250 mm x 4.6 mm	0.8	K ₂ HPO ₄ : ACN: Metanol (65: 26.2: 8.8 (v/v/v).	3.68	210	Citalo- pram	----	Plasma
8	HPLC UV	FR 5 μm 150 mm 4.6 mm	1	H ₃ PO ₄ : ACN	4.45	205	UCB 17025	----	Plasma
3	HPLC UV	C18 250 mm x 4.6 mm. (3.5 μm)	1	ACN: buffer de fosfatos a pH 4.5	6.5	210	S.D	6	Plasma
6	HPLC UV	Venusil XBP C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm	1	K ₂ HPO ₄ 50 mM: ACN (90:10, v/v)	8.58	205	GBP	1 - 60	Plasma
12	HPLC UV	C18 (5 μm), 250 x 4,6 mm	1.5	Metanol: ACN: Agua 30:10:60 (v/v).	3.4	230	CBZ	0.5- 50	Plasma
10	HPLC MS	LC-18-DB 3.3 cm x 3.0 mm, (3 μm)	1.0	Metanol: C ₂ H ₇ NO ₂ (v/v), 0.1% ácido acético.	2.9	----	Ritonivir	1 - 50	Suero Saliva Plasma
3	HPLC IE	Fase reversa 150 4 mm DI	0.8			210	-----	0.5- 200	Suero
9	HPLC DAD	55 mm x 4 mm, (3 μm).	1.0	ACN: Agua	6.42 min.	220	-----	----	Plasma

Met: Método, R: Referencia, SI: Estándar interno, FR: Fase Reversa, ACN: Acetonitrilo, K₂HPO₄: dihidrogenofosfato de potasio, H₃PO₄: ácido fosfórico, C₂H₇NO₂: acetato de amonio, HPLC: Cromatografía de líquidos de alto rendimiento, UV: Ultravioleta. MS: Masas, IE: Inmunoensayo, DAD: Diodos, S: Sensibilidad, λ : longitud de onda, TR: Tiempo de retención, nm: nanómetro, μg : microgramos, mL: mililitro, UCB 17025: 2,2-trimetil-5-oxo-1 pirrolidina acetamida), GBP: Gabapentina, CBZ: Carbamazepina; v/v: volumen/volumen.

PARTE EXPERIMENTAL

Para encontrar las condiciones cromatográficas se realizó un espectro de absorbancia de una solución de LEV a una concentración de 1 mg/ml en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV/Vis Spectrophotometer.

Reactivos y equipos: Los estándares LEV (85% pureza) y Captopril (98% pureza), así como los solventes grado HPLC, acetonitrilo, diclorometano y agua utilizados fueron de la marca J.T. Baker fueron, el ácido fosfórico H₃PO₄ fue grado reactivo (84% pureza).

Se utilizó una centrifuga Mikro 200, un agitador Vortex Genie- 2 de Scientific industries, una balanza analítica Sartorius, un sonicador/Baño ultrasonido BRANSON 2510 de Lab-Tech y un congelador a -20 °C thermo scientific.

Sistema cromatográfico: El sistema cromatografico fue de la marca HPLC Agilent Technologies 1200 series dotado de: desgasificador G1322A, Bomba cuaternaria G1311A, Inyector G1329A, Horno G1316A y Detector UV G1314B, Columna Restek C18 250 x 4,6 y 5 μ .

Soluciones de trabajo: Se preparo el stock de trabajo de LEV y captopril a una concentración de 1mg/ml en agua (grado HPLC) y suero (pool de suero de ratón). Los stocks fueron alicuotados y almacenados a -20°C hasta su uso

A partir del stock se prepararon los puntos de la curva de calibración (1, 5, 25, 45, 65, 85 y 105 μ g/ml).

Validación del método analítico: La validación del método se realizó de acuerdo con los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, sección 9, criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia. Sección 9.1. Validación de métodos analíticos (características de desempeño).

El rango de trabajo se estableció en función de las concentraciones en plasmáticas de LEV previamente reportadas por Tomson y colaboradores (2007), las cuales se encuentran en el intervalo de 5– 105 μ g/ml.

Linealidad: La linealidad se estableció mediante la curva de calibración en suero en el rango de trabajo evaluando 6 puntos de la curva (5, 25, 45, 65, 85 y 105 μ g/ml) por triplicado. La relación matemática entre concentración y respuesta debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.

Precisión: La precisión se evaluó mediante la repetitividad y reproducibilidad. Para la repetitividad se analizó el mismo día (intra-análisis) por quintuplicado, tres concentraciones conocidas (5, 65 y 105 μ g/ml) en suero de ratón y para la reproducibilidad se evaluaron las mismas concentraciones por duplicado durante tres días (inter-análisis), en suero. Después se determinó el coeficiente de variación, teniendo como criterio de aceptación que el coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 % como lo marca la norma para poder afirmar la existencia de reproducibilidad.

Exactitud: La exactitud se estableció mediante el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetitividad y reproducibilidad, los cuales deben estar dentro del \pm 15 % del valor nominal de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%. Para lo cual se determinó la desviación estándar de la concentración obtenida respecto al valor nominal. A partir de la siguiente fórmula 1:

$$\% \text{ desviación} = 100x \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}}$$

Recuperación absoluta (recobro): Se analizaron por triplicado cuatro concentraciones conocidas: 5 μ g/ml (baja), 25 y 65 μ g/ml (media) y 105 μ g/ml (alta) de Levetiracetam, tanto en suero como en solución. De acuerdo a la norma el porcentaje de recobro no deberá ser necesariamente 100 %, pero deberá ser consistente, preciso y reproducible en todo el intervalo de la curva de calibración.

Estabilidad de la muestra: Se analizaron tres concentraciones (45, 65, 85 μ g/mL) de LEV en suero a corto y largo plazo, diferentes temperaturas (ambiente y -20°C) y ciclos de congelación-descongelación.

Límite de cuantificación: Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo (5 μ g/ml). Criterio de aceptación: Se consideró que el punto tiene validez como límite de cuantificación si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal y el coeficiente de variación no es mayor al 20%.

Límite de detección: Se determinó la concentración a la cual la señal del LEV en suero puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés. Se sustentó científicamente el criterio empleado para establecerlo.

Selectividad: Se demostró la selectividad mediante la no interferencia de compuestos endógenos en suero, al analizar el suero proveniente de seis posibles interferencias. Analizar suero normal, lipémico, hemolizado, normal con atrovastatina y lipémico con mucilago. Se analizaron 6 muestras de suero provenientes de diferentes ratones de la cepa Balb-c para verificar la ausencia de picos en el cromatograma interferentes con el analito en cuestión.

RESULTADOS

Para la validación del método analítico como primer paso se buscaron las condiciones cromatografías óptimas, para lo cual se realizó un barrido espectrofotométrico en solución del analito a cuantificar (LEV) mostraron el pico de máxima absorbancia a 231 nm

Las condiciones cromatograficas en las cuales se obtuvo la mejor separación y resolución de LEV fueron a una temperatura de columna de 35°C, fase móvil isocrática con flujo constante de 1.5 ml/min. La fase móvil consistió en ácido fosfórico (0.43%) y acetonitrilo en una proporción 90:10 v/v. El tiempo de elución total fue de 6 minutos por muestra.

En la imagen 1 se muestra el cromatograma obtenido de la LEV y el estándar interno (SI) en solución en las condiciones previamente establecidas.

Cromatograma 105 µg/mL

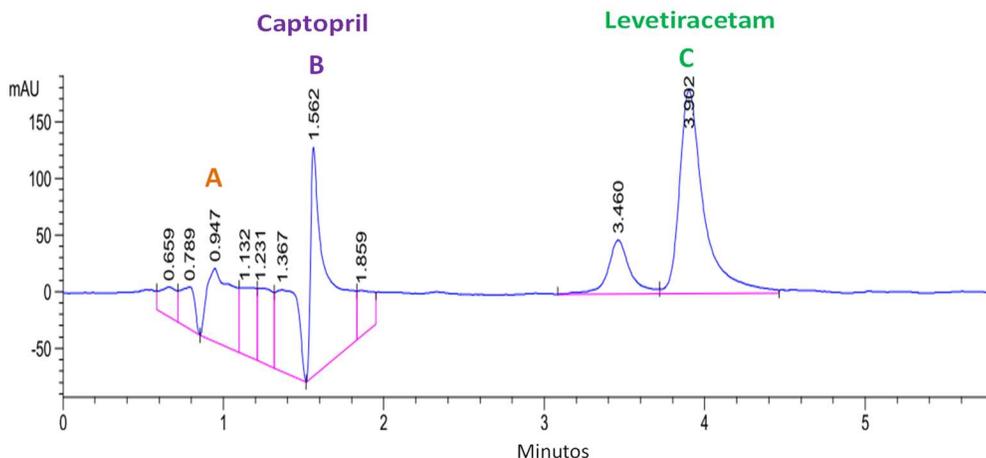


Figura 1. Cromatograma correspondiente a la mezcla de levetiracetam y captopril utilizados en el análisis a una concentración de 105 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente en suero de ratón. Tiempo de corrida de 6 min; A. Frente de solvente a un tiempo de 0.947 min. B. Captopril con un tiempo de retención de 1.562 min. C. Levetiracetam con un tiempo de retención de 3.902 min.

La linealidad en solución se estableció dentro del rango de concentración definida (5-105 µg/ml). La ecuación lineal obtenida fue $y = 108.76 x$ con un valor de $r^2 = 0.995$.

Se estandarizó el método de extracción de LEV en suero, basándonos en los solventes previamente reportados (tabla 2), para lo cual se mezclaron 190 µL de suero y 10 µL del estándar interno (captopril 1 mg/mL). Posteriormente se realizó la extracción del analito con el solvente correspondiente (tabla 2), se agitó en vórtex y se mezcló durante 2 h. Posteriormente el tubo fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a otro vial para llevarlo a sequedad y se reconstituyó en 60 µL de la fase móvil para su análisis por HPLC/UV.

Tabla 2. Solventes de extracción para Levetiracetam.

Referencias	Solvente	Volumen suero + EI	Volumen Solvente
Naidu et al., 2010	Metanol	200 µl	1 ml
Antonilli et al., 2011	Acetonitrilo	150 µl	1ml
Juenke et al., 2006	Cloroformo/ Isopropanol	500 µl	5 ml (90:10)
Freitas et al., 2015	Diclorometano	200 µl	1 ml

De acuerdo a los resultados de linealidad y recobro el método de extracción óptimo fue el que utiliza como solvente de extracción diclorometano (tabla 3)

Tabla 3. Resultados de linealidad y recobro con diferentes solventes.

Referencia	Solvente	Linealidad suero				Recobro promedio
		r ²	R	m	B	
Naidu et al., 2010	Metanol	0.984	0.991	56.249	-154.54	51.82
Antonilli et al., 2011	Acetonitrilo	0.973	0.986	39.82	-53.09	111.31
Juenke et al., 2006	Cloroformo/ Isopropanol	0.510	0.714	36.61	469.87	121.02
Freitas et al., 2015	Diclorometano	0.99	0.998	19.526	0.9307	97.64

El método se validó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

La linealidad del método se estableció mediante la cuantificación de 6 concentraciones dentro del rango de trabajo (5 a 105 µg/ml) mediante el coeficiente de correlación, el cual describe la relación entre la concentración y la respuesta. El coeficiente de correlación para LEV fue mayor a 0.99 y en ninguna de las concentraciones evaluadas por triplicado el coeficiente de variación entre las áreas obtenidas fue superior al 10% indicándonos una baja dispersión entre las mediciones de una misma concentración.

La precisión se determinó en base a la repetitividad y reproducibilidad del método. Para determinar la repetitividad del método se analizaron en un mismo día (intra-análisis) por quintuplicado, las concentraciones correspondientes a los puntos control (PC) que se manejaron durante el proceso de validación, PC1 (5 µg/mL), PC2 (65 µg/mL) y PC3 (105 µg/mL) de LEV en suero. El coeficiente de variación para el analito de interés fue ≤ 7.67 .

La reproducibilidad del método se determinó al analizar por duplicado durante tres días (inter-análisis), las concentraciones correspondientes a los PC1, PC2 y PC3 del LEV en suero. El coeficiente de variación fue ≤ 11.97 .

La exactitud del método se estableció mediante los resultados de repetibilidad y reproducibilidad, mediante la fórmula 1, obteniéndose un porcentaje de desviación estándar de 5.53%.

El recobro absoluto se obtuvo del área bajo la curva por triplicado de las concentraciones de 5, 25, 65 y 105 µg/mL de LEV en solución y suero. El recobro obtenido fue en el intervalo del 87.6 al 92.66 %.

Las concentraciones de 5 µg/ml y 105 µg/ml de LEV se analizaron para evaluar su estabilidad a corto y largo plazo y diferentes temperaturas

Después de 1 h de su preparación a temperatura ambiente el coeficiente de variación fue de 11.62 y 2.60 respectivamente. Después de 24 h LEV fue estable a temperatura ambiente, a partir de las 72h el analito muestra degradación. Lev fue estable en congelación a -20°C después de 30 días, sin embargo, el analito sufre degrada después de ser sometido a ciclos de congelación y descongelación (figura 2).

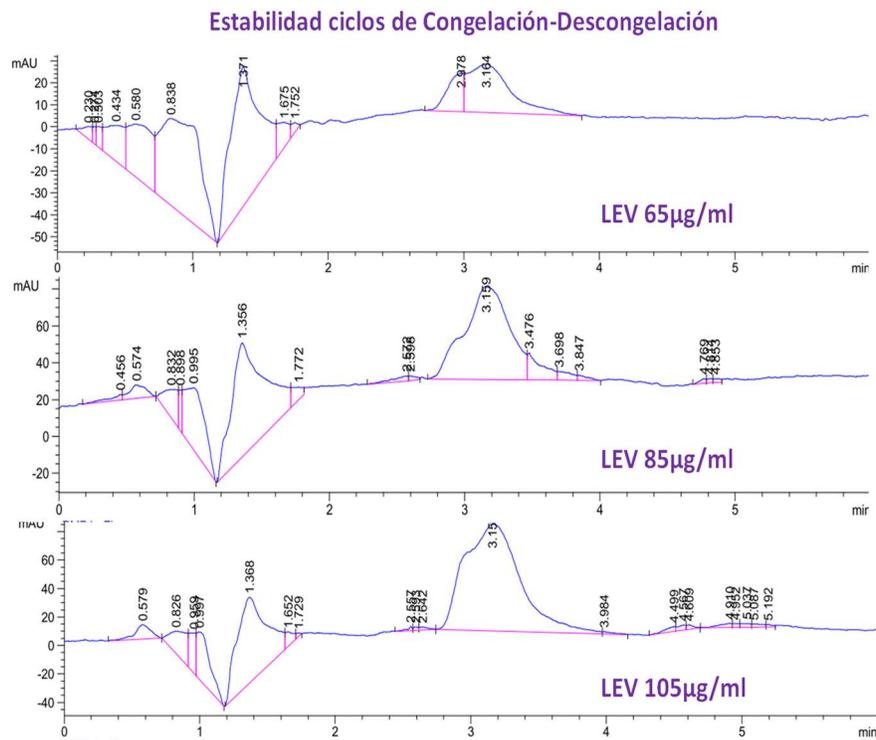


Figura 2. Estabilidad en ciclos de Congelación y descongelación Levetiracetam.

La sensibilidad del método se determinó mediante el límite de cuantificación y el límite de detección. El límite de cuantificación fue de 5 µg/mL para el analito, con un coeficiente de variación de 11.88 % y el límite de detección fue de 1 µg/mL.

La selectividad del método se estableció al analizar seis muestras de suero de seis diferentes ratones, buscando posibles interferencias como son compuestos endógenos de la matriz biológica, anticoagulantes, metabolitos en su caso y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante. No se encontró ninguna señal en el tiempo de retención del analito.

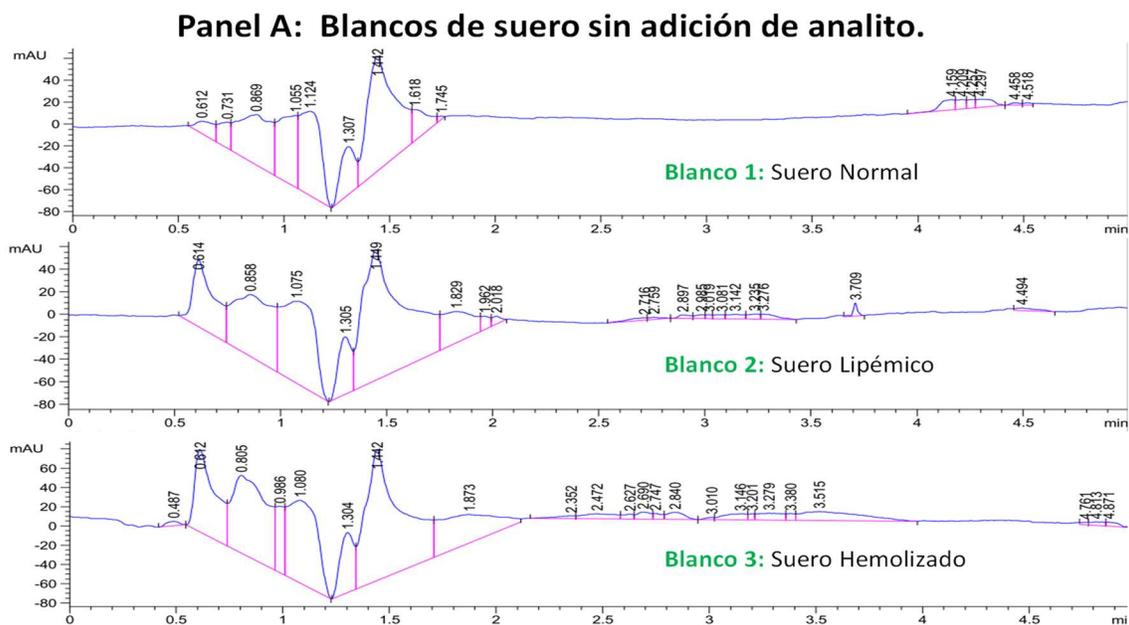


Figura 3. Selectividad en ratones diferentes.

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la cuantificación de LEV por HPLC-UV, fue validado de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, cumpliendo con los parámetros de exactitud, precisión, linealidad y reproducibilidad, por lo que puede ser empleado en estudios de farmacocinética y bioequivalencia.

REFERENCIAS

1. Arabiah H. 2019 "Levetiracetam." Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2(44):167-199.
2. Baldelli, Sara, Dario Cattaneo, Luciana Giodini, Lorena Baietto, Giovanni Di Perri, Antonio D'Avolio, and Emilio Clementi. 2015. "Development and Validation of a HPLC-UV Method for the Quantification of Antiepileptic Drugs in Dried Plasma Spots." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 53(3):435-44.
3. Bianchi, Vincenza, Carlo Arfini, and Matteo Vidali. 2014. "Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam: Comparison of a Novel Immunoassay with an HPLC Method." Therapeutic Drug Monitoring 36(5):681-85.
4. Contin, Manuela, Susan Mohamed, Carmina Candela, Fiorenzo Albani, Roberto Riva, and Agostino Baruzzi. 2010. "Simultaneous HPLC-UV Analysis of Rufinamide, Zonisamide, Lamotrigine, Oxcarbazepine Monohydroxy Derivative and Felbamate in Deproteinized Plasma of Patients with Epilepsy." Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 878(3-4):461-65.
5. Contin, Manuela, Susan Mohamed, Fiorenzo Albani, Roberto Riva, and Agostino Baruzzi. 2008. "Simple and Validated HPLC-UV Analysis of Levetiracetam in Deproteinized Plasma of Patients with Epilepsy." Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 873(1):129-32.
6. Engelbrecht, Lynette, C. J. Grobler, and Malie Rheeders. 2017. "A Simple and Cost-Effective HPLC-UV Method for the Detection of Levetiracetam in Plasma/Serum of Patients with Epilepsy." Biomedical Chromatography 31(10).
7. Freitas P, Santi F, Bertucci C, Alexandre V, Carvalho S, Leira L, Ceiki A and Costa R. 2015. Stir-bar-sorptive extraction, solid phase extraction and liquid-liquid extraction for

- levetiracetam determination in human plasma: comparing recovery rates. *Pharmaceutical sciences*. 51 (2), 392-402.
8. Giroux PC, Salas-Prato M, Theoret Y and Carmant L. 2009. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: lack of correlation between plasma concentration and efficacy. *Seizure* 8(8):559-63.
 9. Gonçalves J, Alves G, Bicker J, Falcão A, Fortuna A. 2018. Development and full validation of an innovative HPLC-diode array detection technique to simultaneously quantify lacosamide, levetiracetam and zonisamide in human plasma. *Bioanalysis* 10(8):541-557. doi:10.4155/bio-2017-0199
 10. Guo, Tiedong, Lisa M. Oswald, Damodara Rao Mendu, and Steven J. Soldin. 2007. "Determination of Levetiracetam in Human Plasma/Serum/Saliva by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *Clinica Chimica Acta* 375(1-2):115-18.
 11. Howard P, Remi J, Remi C, Charlesworth S, Whalley H, Bhatia R, Hitchens M, Mihalyo M and Wilcock A. 2018. Levetiracetam. *J Pain Symptom Manage*, 56 (4): 645-649.
 12. Ibrahim F, Yazbi A, Barary M and Wagil M. 2016. Sensitive inexpensive HPLC determination of four antiepileptic drugs in human plasma: application to PK studies. *Bioanalysis*, 8 (21): 2219-2234.
 13. Juenke, Jo Etta M., Paul I. Brown, Francis M. Urry, and Gwendolyn A. McMillin. 2006. "Drug Monitoring and Toxicology: A Procedure for the Monitoring of Oxcarbazepine Metabolite by HPLC-UV." *Journal of Chromatographic Science* 44(1):45-48.
 14. Koc, S. Keskin Guler, O. Karadas, T. Yoldas and Z. Gokcil. 2018. "Fetal safety of levetiracetam use during pregnancy". *Acta Neurol Belg* 118: 503-508.
 15. Krasowski MD. *Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy Medications. Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(6):1909-1935. doi:10.3390/ph3061909
 16. Leandro de Campos Michel, Elias Carvalho Padilha and Rosangela Goncalves Peccinini, (2013) "A Review of Pharmacokinetic Parameters of Metabolites and Prodrugs", *Drug Metabolism Letters* 7: 105.
 17. Martens-Lobenhoffer, Jens and Stefanie M. Bode-Böger. 2005. "Determination of Levetiracetam in Human Plasma with Minimal Sample Pretreatment." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 819(1):197-200.
 18. Pérez c., carlos. (2002). Medición de niveles plasmáticos. *Revista chilena de infectología*, 19(Supl. 1), S33-S37. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019100006>
 19. Santos Zambrano J, Benítez Díaz A, Castro Martínez E. 2011. Levetiracetam endovenoso en el tratamiento de la epilepsia en la Sala de Urgencias. *Archivos de Medicina de Urgencia de México* 3(1): 34-40.
 20. Sarmiento, Luz Adriana. 2014. "Levetiracetam Determination in Serum by HPLC-UV." *Revista Med* 22(1):12-19.
 21. Tomson, Torbjörn, Cecilie Johannessen Landmark, and Dina Battino. 2013. "Antiepileptic Drug Treatment in Pregnancy: Changes in Drug Disposition and Their Clinical Implications." *Epilepsia* 54(3):405-14.

CINÉTICA DE INTERCAMBIO IÓNICO ENTRE LA ZEOLITA ZSM-5 (SI/AL:40) Y EL CATIÓN Ni^{+2} EN SOLUCIÓN DE $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

Jessica Berenice Cervantes Zaragoza¹, Víctor M. Soto², y Karina V. Chavez.²

¹Laboratorio del Estado Sólido, Departamento de Química, ²Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino Garcia Barragán #1421, esq Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México. beerenicecz@hotmail.com

RESUMEN

En este trabajo estudiaremos la velocidad de intercambio iónico del catión +2 de níquel, en la zeolita ZSM-5 con relación (Si/Al: 40). El proceso de intercambio iónico es muy simple, ya que se pone en contacto la zeolita (que posee cationes amonio), en la solución de nitrato de níquel y se lleva a cabo espontáneamente. Éste es un paso previo para la síntesis de nanopartículas de níquel soportadas en la zeolita, lo que le da su gran importancia. Sin embargo aunque este es un proceso sencillo, en la literatura se encuentra muy escasa información acerca de este proceso de intercambio iónico. Mucho menos del níquel con esta zeolita en particular. Nosotros proponemos obtener la ecuación cinética de intercambio iónico con el fin de tener una buena herramienta para controlar el tamaño final de las nanopartículas a sintetizar. Es por eso de la importancia de este estudio.

INTRODUCCION

Las zeolitas son minerales cristalinos hidratados, cuya estructura forman cavidades ocupadas por iones y moléculas de agua con gran libertad de movimiento que permiten el intercambio iónico. Están formadas de silicio, aluminio y oxígeno. Por cada aluminio que se encuentra en la estructura existe un catión de estado de oxidación +1, que generalmente pueden ser, sodio, hidrógeno o amonio [1]. En nuestro caso el catión intercambiable que posee la zeolita ZSM-5 es el amonio (NH_4^+). La aplicación del intercambio iónico sigue siendo una de las técnicas más aplicadas para la remoción de metales pesados del agua. Esto sobre técnicas más sofisticadas como la precipitación química, electroflotación y ósmosis inversa entre otros [2].

Esta preferencia se debe a la relativa sencillez del método de intercambio, iónico que resulta ser espontáneo. Sin embargo en nuestro caso el estudio del intercambio catiónico es para poder conocer la cantidad de cationes de níquel que se intercambian en la zeolita, en función del tiempo. Esto nos dará la pauta para poder elegir la cantidad adecuada de cationes para su posterior transformación a nanopartículas mediante el proceso de reducción con hidrógeno gas.

TEORIA

La parte importante en el intercambio catiónico es el potencial de intercambio que es generado por la diferencia de concentración de cationes de la misma especie presentes en el sólido, en este caso la zeolita, y la solución que contiene el catión intercambiable. El proceso de intercambio se lleva a cabo hasta que se llega a un equilibrio en el que coexisten cationes de la misma especie tanto en solución como intercambiados en el sólido. El estudio del intercambio catiónico ha sido desarrollado desde diferentes puntos de vista, uno de ellos considera este proceso como una reacción química de intercambio, con sus estudios cinéticos correspondientes. Otro punto de vista es el considerar como de importancia mayor los coeficientes de difusión de las especies involucradas [3]. Se han resuelto las ecuaciones para la difusión de los cationes considerando una partícula esférica a condiciones de volumen y presión constantes [4]:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2}\right) \exp\left(\frac{-n^2\pi^2 D^i t}{r^2}\right) \quad (1)$$

Donde las "Q" son las cantidades intercambiadas a tiempo "t" y en el equilibrio " ∞ "; " D^i " es el coeficiente de difusión efectivo; "r", es el radio de las partículas esféricas; "t", es el tiempo y "n" es una constante.

En el desarrollo de esta expresión se hicieron las siguientes consideraciones, el proceso es de difusión y las partículas consideradas son esféricas. El camino del desarrollo de una teoría de

intercambio catiónico ha sido un camino largo y sinuoso [3]. En nuestro caso propondremos una ecuación empírica para poder correlacionar la cantidad de níquel intercambiada por gramo de zeolita en función del tiempo de intercambio en un sistema no forzado. Le llamamos sistema no forzado a aquel que solo depende de la difusión de las especies a temperatura y presión constante, sin usar agitación.

Una ecuación empírica nos dará una idea de la velocidad con que se intercambian los cationes de níquel en la Zeolita y de esta manera poder después elegir la cantidad adecuada de cationes en la zeolita para después transformarlos en Nano partículas.

PARTE EXPERIMENTAL

En este trabajo, usamos la zeolita sintética ZSM-5, obtenida de la firma, *Zeolyst International*, con relación silicio / aluminio, igual a 40 (CBV-8014), Nitrato de Níquel, *Alfa Aesar* 99.99%, agua deionizada.

Cálculos

Se calcula la cantidad máxima posible de intercambio iónico de la zeolita a partir de su fórmula química. $(\text{NH}_4)_{2.34}\text{Al}_{2.34}\text{Si}_{93.66}\text{O}_{192}\cdot 16\text{H}_2\text{O}$. La masa fórmula que se obtiene de la zeolita es 6096.16 g/mol, y por lo tanto podemos determinar que 1.17 moles de níquel como máximo pueden intercambiarse en un mol de zeolita. Si observamos 1.17 moles es justamente la mitad de 2.34 que son los que la fórmula nos muestra. La explicación es sencilla. Si consideramos que el níquel como catión tiene una carga de +2, así que cada níquel, agota dos sitios. Por lo tanto tenemos que, 1.9192×10^{-4} moles de níquel por gramo de zeolita representarían un 100% de intercambio iónico. En el proceso experimental introducimos 100 mg de zeolita en 8.0 mL de solución de nitrato de níquel. Esto significa que para una saturación del 100%, tendríamos que tener 1.9192×10^{-5} moles de níquel en los 8.0 mL de solución. Esto representa una molaridad de 2.400×10^{-3} . Sin embargo se preparó una solución de alrededor de tres veces este valor. 6.966×10^{-3} M. La razón de esto es que ya tenemos por sabido que no se lleva a cabo un intercambio al 100%. Por lo que al usar una concentración más grande, podemos “forzar” a que haya mayor intercambio, que utilizando la concentración justa necesaria. Esto está en concordancia con el punto de vista de incrementar el potencial de intercambio iónico al aumentar la concentración de cationes de níquel en la solución. Esta solución será el punto de partida para el intercambio iónico en función del tiempo. Se sometió a diferentes tiempos de intercambio cada muestra de 100 mg de zeolita. Una vez pasado el tiempo de intercambio, se valoró el contenido de cada solución remanente. Se utilizó el método de titulación de Ni^{+2} con EDTA estandarizado [5].

Esquema

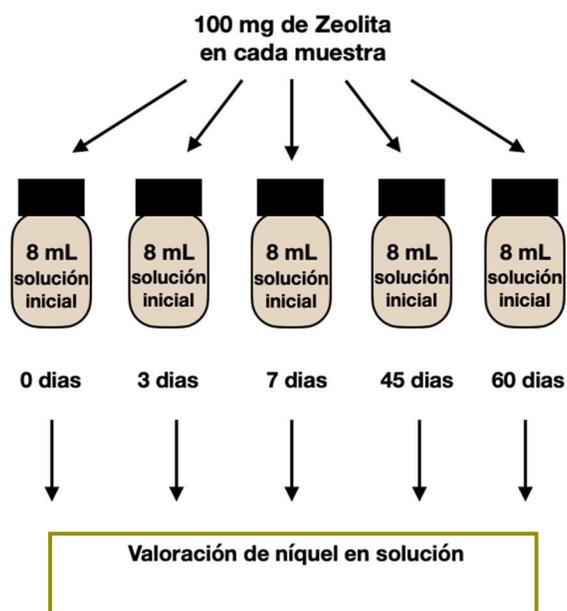


Figura 1. Esquema parte experimental

RESULTADOS

Los resultados de la valoración del níquel, los presentamos en la siguiente tabla:

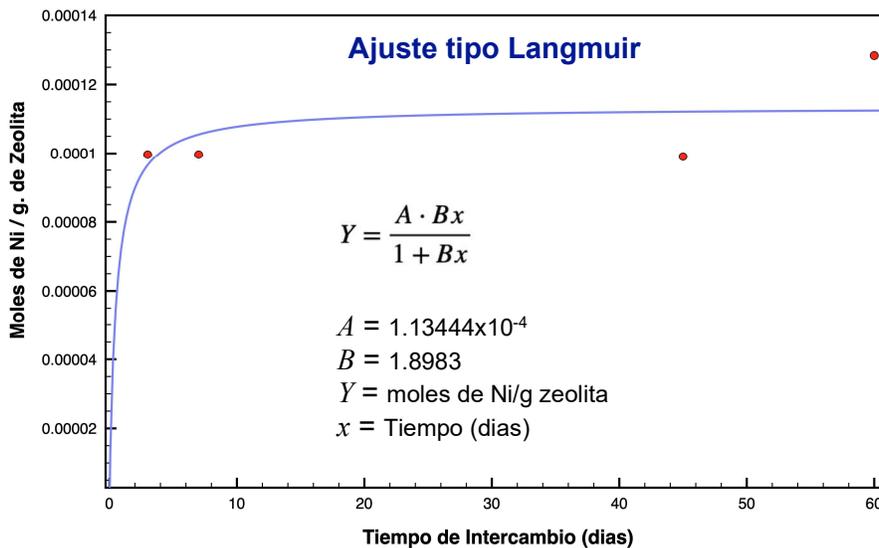
Tiempo (días)	Conc. Solución inicial	Conc. Solución remanente	Diferencia	Moles intercambiados	Masa de Zeolita	Relación de intercambio
0	6.96635E-03	6.96635E-03	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E-01	0.00000E+00
3	6.96635E-03	5.70000E-03	1.26635E-03	1.01308E-05	1.01700E-01	9.96146E-05
7	6.96635E-03	5.70000E-03	1.26635E-03	1.01308E-05	1.01700E-01	9.96146E-05
45	6.96635E-03	5.70000E-03	1.26635E-03	1.01308E-05	1.02300E-01	9.90303E-05
60	6.96635E-03	5.32000E-03	1.64635E-03	1.31708E-05	1.02600E-01	1.28370E-04

Tabla 1. Resultados de valoración de Níquel

En la primera columna están tabulados los días que transcurrieron en el proceso de intercambio. En la columna de moles intercambiados se tomó en cuenta el volumen de la solución, esto es, 8 mL. La concentración inicial y la de la solución remanente están dadas en moles de níquel por litro. En la columna que dice masa de zeolita, podemos leer, la cantidad de zeolita que fue introducida en cada frasco. La cual es aproximadamente 100 mg. En la columna en que se lee, relación de intercambio, se reportan los moles de níquel por gramo de zeolita.

Se puede apreciar que la relación de intercambio a los sesenta días es de 1.2837×10^{-5} moles de níquel por gramo de zeolita. Esto representa el 67% del intercambio iónico teórico posible calculado con anterioridad basándonos en la fórmula química de este tipo de zeolita.

Las dos columnas que ahora graficaremos son la primera, es decir el tiempo y la séptima, es decir la cantidad de níquel intercambiado por gramo de zeolita.



Grafica 1. Ajuste tipo Lanqmuir

Los puntos rojos son los valores experimentales, y la curva azul es el ajuste proporcionado por una ecuación tipo Langmuir. Esta distribución de puntos es muy parecida a la encontrada en estudios

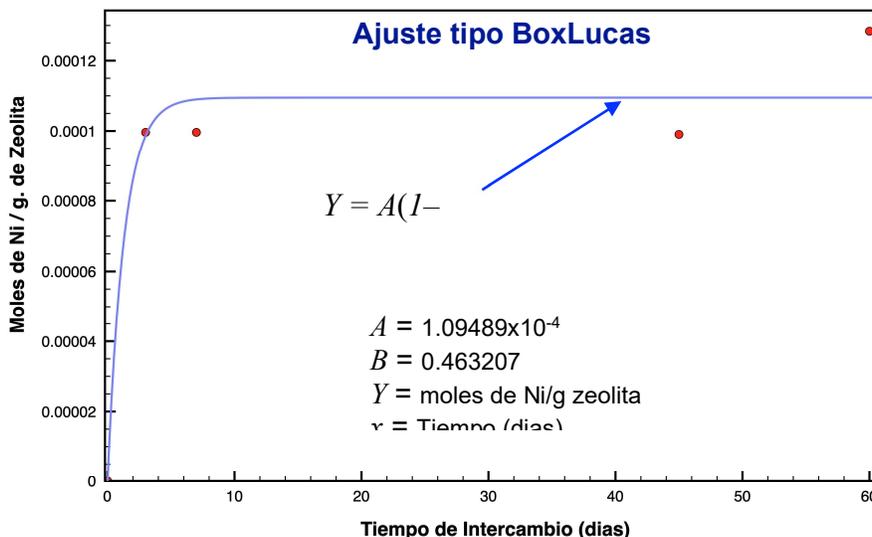
con otras zeolitas, por ejemplo en zeolita “A”, en el trabajo de Biserka Biskup et al. (2004) [3]. La forma de la curva es asíntota, es decir está acotada a un valor, en este caso si aplicamos límite infinito al tiempo, obtenemos que el valor de las ordenadas sería el del parámetro “A”, 1.13444×10^{-4} . Este valor está a un 12% de diferencia con respecto al experimental. Observando las aproximaciones en la tabla tenemos:

Tabla del ajuste tipo Langmuir

Dias de Intercambio	Valor Experimental	Valor Calculado	% Desviación
0	0.0000	0.0000	0.0000
3	9.9614500E-05	9.6499200E-05	3.1274
7	9.9614500E-05	1.0550420E-04	5.9125
45	9.9030500E-05	1.1213130E-04	13.2291
60	1.2837050E-04	1.1245670E-04	12.3968
		Total:	6.9332

Tabla 2. Ajuste tipo Lanmuir

Lo cual nos muestra un 6.9332% de desviación total. No esta mal para un modelo tipo Langmuir, en el que la correlación semi-empírica, nos propone que el parámetro “A”, es el máximo valor de captación de níquel que podemos esperar a temperatura ambiente. Otra posibilidad de ajuste es con la ecuación llamada de BoxLucas [6]. En la siguiente figura podemos observar el ajuste logrado.



Grafica 2. Ajuste tipo Box Lucas

Ambas curvas son muy parecidas, pero en el punto correspondiente a los tres días, esta ecuación es más precisa que la tipo Langmuir. Sin embargo aun con este detalle, el % de desviación global, es mayor que la anterior, como leeremos más adelante. El parámetro “A” también nos proporciona

el valor máximo posible de intercambio catiónico a tiempo infinito. Este valor es de 1.09489×10^{-4} , el cual difiere en un 15%, del valor obtenido experimentalmente.

A continuación presentamos los valores del ajuste en comparación con los valores experimentales y el cálculo de la desviación aritmética global.

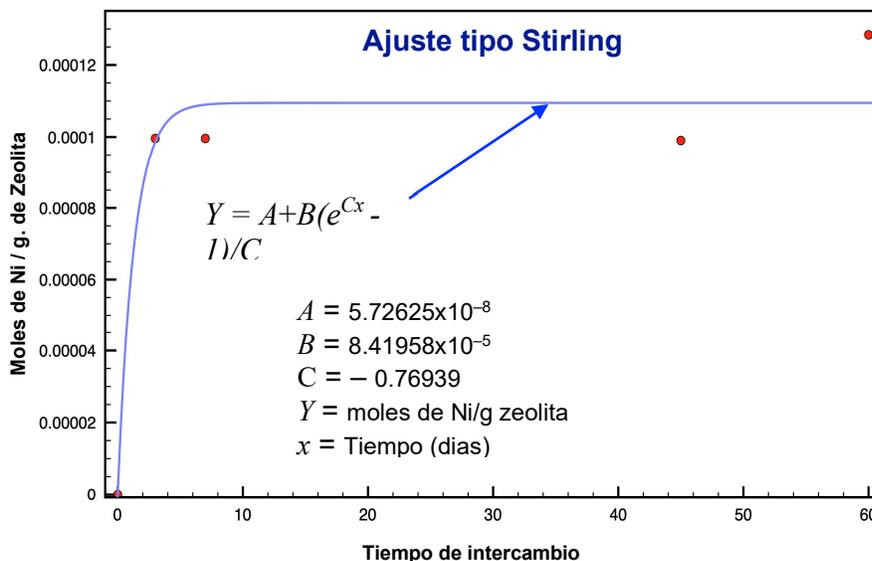
Tabla del ajuste tipo BoxLucas

Dias de Intercambio	Valor Experimental	Valor Calculado	% Desviación
0	0.0000	0.0000	0.0000
3	9.9614500E-05	9.8607300E-05	1.0111
7	9.9614500E-05	1.0898800E-04	9.4098
45	9.9030500E-05	1.0948900E-04	10.5609
60	1.2837050E-04	1.0948900E-04	14.7086
		Total:	7.1380

Tabla 3. Tipo ajuste Box Lucas

Con esto podemos ver que la desviación global de la curva de BoxLucas es de 7.1380%, la cual es mayor al 6.9332% de la del tipo Langmuir.

Otra tipo de ajuste lo podemos lograr con la ecuación de Stirling [5]. En la siguiente figura podemos apreciar el nuevo ajuste logrado.



Grafica 3. Ajuste tipo Stirling

Y su correspondiente tabla donde leemos una desviación global del 7.1381%.

Tabla. 4 del ajuste tipo Stirling

Dias de Intercambio	Valor Experimental	Valor Calculado	% Desviación
0	0.0000	0.0000	0.0000
3	9.9614500E-05	9.8606900E-05	1.0115
7	9.9614500E-05	1.0898780E-04	9.4096
45	9.9030500E-05	1.0948920E-04	10.5611
60	1.2837050E-04	1.0948920E-04	14.7084
		Total:	7.1381

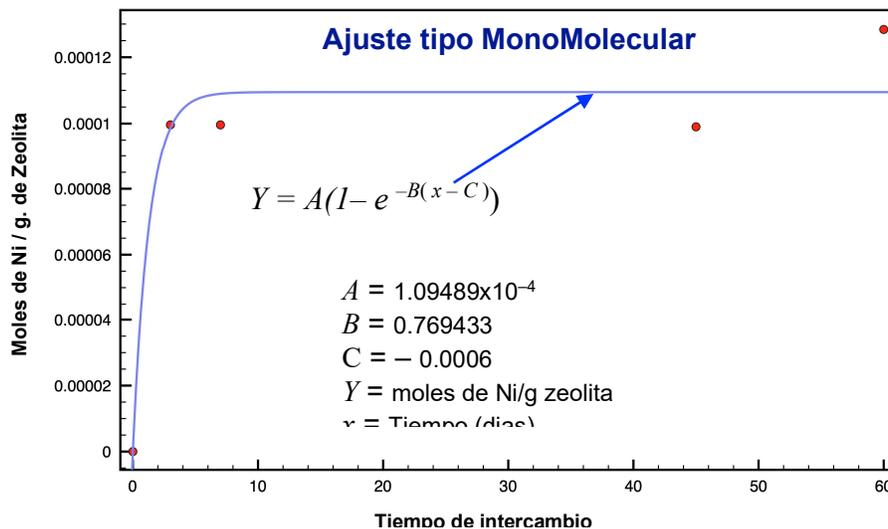
Finalmente hacemos un ajuste usando la ecuación conocida como MonoMolecular, usada en reacciones químicas en cadena [7].

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{ABx}{1+Bx} \right) \Rightarrow \left(\frac{AB}{(1+Bx)^2} \right)$$

Y su correspondiente tabla donde leemos una desviación global del 7.1400%.

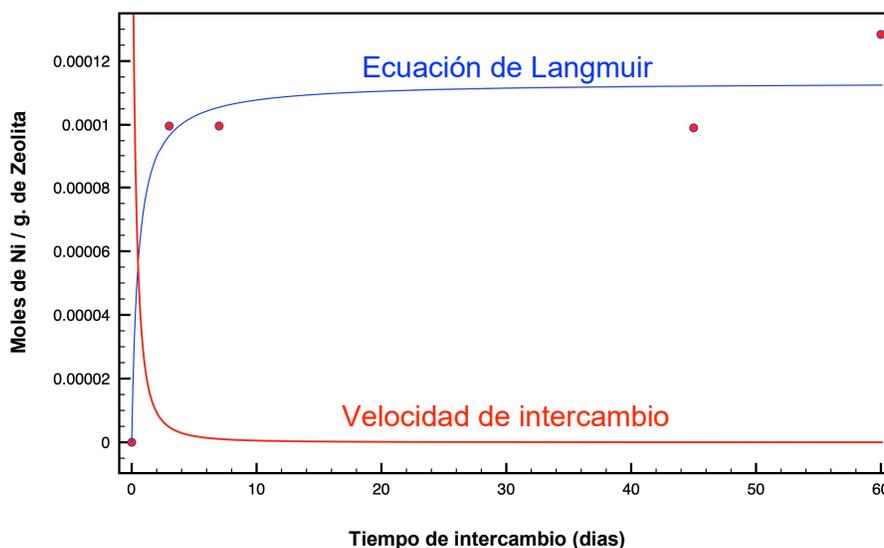
Tabla 5. Ajuste tipo Mono Molecular

Dias de Intercambio	Valor Experimental	Valor Calculado	% Desv. line.
0	0.0000	0.0000	0.0000
3	9.9614500E-05	9.8596797E-05	1.0216
7	9.9614500E-05	1.0898727E-04	9.4090
45	9.9030500E-05	1.0948900E-04	10.5609
60	1.2837050E-04	1.0948900E-04	14.7086
		Total:	7.1400



Uno de los puntos de interés al hacer este tipo de curvas, es obtener la velocidad instantánea, con la que se lleva a cabo este fenómeno de intercambio iónico. Para lograr esto, procedemos entonces, a obtener la derivada de la curva de ajuste. Esta es una de las grandes ventajas de hacer un ajuste. Las curvas nos señalaron un comportamiento asintótico, el cual ya esperábamos y ahora podemos obtener la forma de la curva de velocidad de modo sencillo. Elegiremos para esto la curva tipo Langmuir, la cual mostró un mejor ajuste al tener el menor índice de desviación, y que se transforma de la siguiente manera:

(2)



Grafica 5. Ecuación Lanquair

La curva roja que representa la velocidad de intercambio. Podemos observar que cae abruptamente hasta casi cero entre los 10 y 15 días de intercambio iónico. Es por eso que a este podemos afirmar que en este intervalo de tiempo, se llevaba a cabo la mayor cantidad de intercambio iónico. Por lo que sí nuestro objetivo es el de dosificar la cantidad de níquel presente en la zeolita para su posterior uso, deberá tenerse en cuenta que la incorporación del metal ocurre en las dos primeras semanas de intercambio.

Este es un dato privilegiado ya que la cantidad de níquel intercambiado afecta de manera directa al número de nanopartículas que se sintetizan usando reducción mediante flujo de hidrógeno y en última instancia es un paso más, para lograr el control de tamaño que pretendemos conseguir en un futuro.

CONCLUSIONES

El proceso de intercambio catiónico del níquel en la zeolita ZSM-5, es factible de ser modelado de manera sencilla. Se eligió proponer un conjunto de ecuaciones semi-empíricas y empíricas para lograrlo. Se determinó que la mayor cantidad de intercambio sucede en las dos primeras semanas del proceso, a temperatura ambiente. La curva elegida para ajustar los datos experimentales, es la tipo Langmuir, ya que fue la que presentó mejor concordancia con la experimentación, así como el hecho de que se le puede asociar al parámetro "A" de la ecuación, el valor máximo experimental de intercambio a tiempo infinito.

Cabe señalar que las bases de la ecuación de Langmuir, no describen precisamente el proceso de intercambio catiónico de nuestro sistema: Zeolita ZSM-5 / Solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, ya que esta

propuesta para un sistema físico. Sin embargo sigue siendo un referente en todos los sistemas de sorción de gases en superficies.

Los valores aquí presentados son estrictamente para el sistema Zeolita ZSM-5 / Solución de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, obtenidos a temperatura ambiente (alrededor de 27°C), y con una relación Si / Al = 40 en la estructura de la Zeolita. Además la solución de níquel se preparó con toda intención al triple de la concentración teórica para saturar a la zeolita. Aún así el grado de intercambio fue de 0.67.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lyan-Yi Chen, Jia-Quan Xu, Hongseok Choi, Marta Pozuelo, Xiaolong Ma, Sanjit Bhowmick, Jenn - Ming - Yang, Suveen Mathaudhu, Xiau - Chun Li, "Processing and properties of magnesium containing a dense uniform dispersion of nanoparticles", *Nature* Vol 528, 2015, pp. 539-543.
2. G. Blanchard, M. Maunaye, G. Martin, "Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolites", *Water Res.* Vol 18, 1984, pp. 1501-1507.
3. Friederich G. Helfferich "Ion Exchange Kinetics" in *Mass Transfer and Kinetics of ion exchange*, (NATO ASI Series, The Hague 1983), Chapter 5, pp. 157-180
4. Biserka Biskup, Boris Subotic, "Kinetic analysis of the exchange processes between sodium ions from zeolite A and cadmium, copper and nickel ions from solutions", *Separation and Purification Technology*. Vol 37, 2004, pp. 17-31.
5. Fernando Orozco, "Análisis Químico Cuantitativo", Editorial Porrúa 1989, XVIII edición.
6. Ratkowsky, David A. "Handbook of Nonlinear Regression Models" Marcel Dekker Inc. 1990.
7. Saber, G. A. F., Wild, C. J. "Nonlinear Regression" John Wiley & Sons, Inc., 1989 pp. 328

ANÁLISIS DE RESPUESTA DE SUPERFICIE PARA OPTIMIZAR LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ORIGEN HEMATOPOYÉTICO DESTINADAS AL ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Jéssica Aneth Vergara Hernández¹, Abelardo Daniel Vergara Hernández², Marco Aurelio Pardo Galván¹, Misael Herrejón Carmona³, Ana Edith Higareda Mendoza¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, ²Instituto Tecnológico de Toluca, ³Hospital Infantil de Morelia.
higareda@umich.mx

RESUMEN

El análisis de células de origen hematopoyético es de gran utilidad en el diagnóstico y en el seguimiento del tratamiento de varias enfermedades como anemia, VIH, leucemia, diversas infecciones, entre otras. Existen diversas técnicas de análisis para este tipo de muestras, entre las cuales encontramos a la citometría de flujo (CF). La CF se perfila como una de las técnicas más importantes para muestras en suspensión como las de origen hematopoyético, esto debido a que permite realizar y describir de manera multiparamétrica a las diferentes subpoblaciones de la muestra, junto con el análisis simultáneo, principalmente, de marcadores o antígenos de superficie, adquiriendo miles de eventos por segundo. Sin embargo, con la descripción de nuevos marcadores intracelulares es necesario que estos protocolos sean modificados para incluir la detección de éstos, ya que requieren incluir el proceso de permeabilización celular para poder detectar las señales intracelulares. Considerando que existen factores que pueden causar variaciones o interferencias en los resultados de un análisis multiparamétrico de CF, el objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo por medio de un análisis de respuesta de superficie (ARS) para minimizar la pérdida celular y evitar la modificación artificial de las señales de fluorescencia en la CF. En base a la experiencia de experimentación y a lo reportado en la bibliografía se identificaron todas aquellas variables que pudieran interferir en el análisis por CF de muestras hemáticas y todos los factores que pudieran interferir en cada una de estas variables. Se generó una matriz de variables y factores para el ARS con el programa Minitab. De acuerdo a los resultados del ARS, las variables experimentales más influyentes, en orden descendente, son: fuerza centrífuga; número de lavados; tiempo de permeabilización; tiempo, temperatura y volumen de fijación; tiempo, temperatura, forma del tubo y volumen de la solución de lisis eritrocitaria. Con los parámetros óptimos obtenidos se estableció un protocolo final, mismo que fue probado con muestras hemáticas. Se obtuvieron todas las subpoblaciones leucocitarias descritas clásicamente para un análisis de CF, las cuales fueron comprobadas por medio de la expresión de CD45. Se determinó que la fuerza centrífuga debe ser de 5 minutos a 500xg y se debe realizar un lavado tras cada paso, a excepción del proceso de permeabilización en el cual se recomiendan dos lavados. Asimismo, la mayor eficiencia de lisis se obtuvo en un tubo de 4 mL con fondo redondo con una relación muestra:buffer de lisis eritrocitaria de 1:14, incubando a TA durante 15 minutos. La fijación celular con paraformaldehído debe ser a TA durante 15 minutos en un volumen final de 500µL, seguida de la permeabilización a TA durante 10 minutos con 0.2% de Tritón. En conclusión, el ARS nos permitió optimizar la metodología de análisis de muestras hemáticas por CF al modelar y analizar los problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras, siendo de mayor impacto las variables temperatura, tiempos de incubación y número de lavados durante las etapas de lisis eritrocitaria, fijación y permeabilización celular.

INTRODUCCIÓN

El análisis de las muestras de origen hematopoyético por citometría de flujo es cada vez mas común ya que se pueden obtener muchos datos por medio de ensayos multiparamétricos con anticuerpos variados para la descripción de las características de las subpoblaciones celulares por medio de la descripción de sus características de tamaño y complejidad así como de los marcadores específicos que nos permiten identificar a los diferentes estirpes celulares (linfocitos, monocitos, granulocitos, plaquetas, células transformadas) lo que resulta útil en la descripción y seguimiento de varias enfermedades. Otra ventaja de analizar las muestras por CF es que el volumen de trabajo es

pequeño (en el orden de los microlitros) por lo que el volumen de la muestra no suele ser un problema mayor. La complejidad del análisis de CF radica en el establecimiento de protocolos para los análisis multiparamétricos en los cuales no se tengan pérdidas celulares significativas, modificaciones en las subpoblaciones (tales como aglomeraciones, pérdidas de las características de tamaño y complejidad por deshidratación por el fijador (como en el caso de alcohol), destrucción celular por una permeabilización excesiva o la presentación de falsos negativos debido a una permeabilización insuficiente. Además de estas variables es necesario establecer un protocolo en el cual los anticuerpos no interfieran entre sí tomando en cuenta los fluorocromos utilizados y el origen de los anticuerpos.

TEORÍA

Los análisis de respuesta de superficie (ARS) son un conjunto de técnicas matemáticas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) utilizadas en el análisis de problemas en los que una respuesta de interés se ve influenciada por varios factores; se entiende por factores a aquellas variables que influyen en la respuesta cualitativa y/o cuantitativamente en la respuesta. El propósito de este análisis es establecer los valores de las variables que optimizan la respuesta. El análisis se realiza después de definir los factores que influyen en la respuesta y éstos se determinan en base a la experiencia del experimentador y a lo reportado en la bibliografía.^{1,2,3}

En el ARS se utilizan términos cuadráticos por lo que es posible observar una curvatura en la respuesta (Fig. 1); esta curvatura nos permite mapear la respuesta ya que se modelan los cambios e influencias de las variables en la respuesta, así como hallar los niveles de influencia y seleccionar las condiciones teóricas óptimas de experimentación determinando así las condiciones óptimas de operación del sistema^{1,3}.

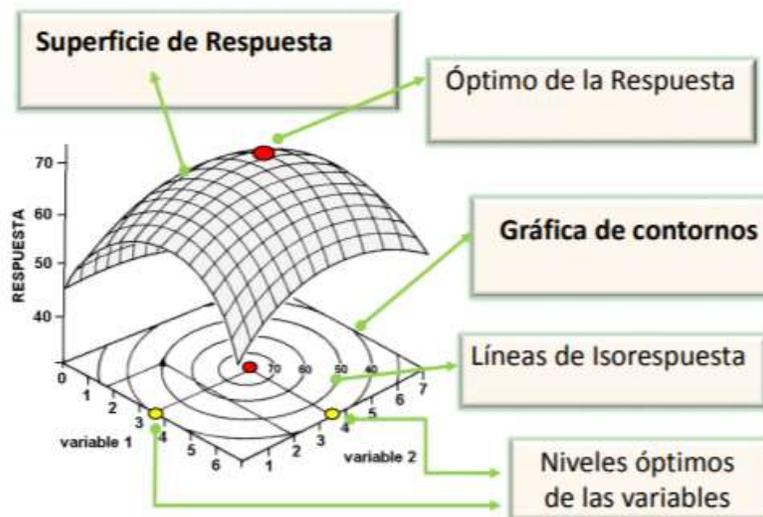


Figura 1: Curvatura de la respuesta. Obtenido de:
https://www.fccb.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/wp-content/uploads/2016/06/3-RSM_Mezclas_2016.pdf

La estandarización de los protocolos utilizados en el análisis de muestras hemáticas es importante ya que esto reduce variables que pueden interferir en la comparación de los resultados de diferentes muestras para la descripción de comportamientos o resultados. Existen protocolos para análisis multiparamétricos de muestras de origen hematopoyético por citometría de flujo (CF) como los descritos en los insertos de los anticuerpos de interés que desean usarse en el análisis por CF o los métodos descritos por la Euroflow cuyo propósito es desarrollar y estandarizar pruebas de citometría de flujo rápidas y sensibles para el diagnóstico, pronóstico, clasificación de neoplasias malignas hematológicas y evaluación de la efectividad del tratamiento durante el seguimiento⁴. De manera

general en estos protocolos se realiza una lisis eritrocitaria inicial ya que los eritrocitos causan interferencias en el análisis de CF. Posterior a la lisis se incuban los anticuerpos superficiales y se fija la muestra. Para el caso de los protocolos con anticuerpos intracelulares tras la lisis se incuban los anticuerpos superficiales, se fija y permeabiliza la muestra y se incuban los anticuerpos intracelulares. Sin embargo, al añadir nuevos marcadores experimentales a un panel multiparamétrico, que incluye la detección de antígenos superficiales e intracelulares, los protocolos establecidos pueden presentar variaciones por lo que es necesario el establecimiento continuo de protocolos.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de la parte experimental se estableció una matriz de variables (Cuadro 1) en base a la experiencia experimental, a lo reportado en el bibliografía^{4,5} y a lo descrito en los insertos de los anticuerpos de interés. Se determinó que la lisis celular, los lavados, centrifugaciones, fijación y permeabilización son las variables a analizar en el proceso.

Cuadro 1: Matriz de variables

Conceptualización	Dimensiones	Sub dimensiones	Factores (Indicadores)	Ítems	Fuente	Instrumentos	
Lisis eritrocitaria	BD FACSTM Lysing Solution		Volumen de solución respecto al de la muestra: 14:1 y 24:1	¿Se modifica la intensidad de fluorescencia?	Sangre con EDTA	Determinación de eficiencia de lisis	
			Temperatura de lisis: 4 y 24°C	¿La eficiencia de lisis depende del volumen de buffer utilizado?			
			Tiempo de lisis: 10 y 15 mL				
			Forma del fondo del tubo: Redondo y cónico				
Concentración celular	Solución de lavado	0.5% de BSA	Centrifugación: 200 y 500 g	¿Se reduce la pérdida celular?	Sangre con EDTA	Medición por citometría de flujo	
		0.4% de BSA	Número de lavados: 1 y 2 veces				Conteo manual
		0.2% de BSA					
Fijación celular	Parafor-Maldehído	2 y 4%	Volumen de solución: 200 y 500 µL	¿Se reduce la pérdida celular?	Sangre con EDTA	Medición por citometría de flujo	
			Tiempo de fijación: 10 y 15 min	¿Se modifica la intensidad de fluorescencia?			
Permeabilización	Tritón X-100	0.2 y 0.5 %	Temperatura: 24 y 37 °C	¿La eficiencia de permeabilización es mejor?	Sangre con EDTA	Medición con colorante vital por citometría de flujo	
			Tiempo de incubación: 10 y 15 min				Azul de tripano

Se realizaron los experimentos necesarios probando las subdimensiones y dimensiones de cada conceptualización o variable utilizando sangre periférica de voluntarios sanos mayores de 18 años, la toma de muestra se realizó en un tubo Vacutainer® con EDTA. Debido a la cantidad de experimentos que se necesitarían probando diferentes tubos en cada variable se realizó un análisis ANOVA para determinar la influencia de la forma y volumen del tubo por lo que todos los experimentos se realizaron en tubos de 4 mL con fondo redondeado.

Se utilizaron 2 reactivos de casas comerciales siguiendo las instrucciones de los proveedores, éstos son: la solución de lisis de la casa comercial de BD FACS™ con número de catálogo 349202 y el tritón 100X de la marca SIGMA con número de lote 118k01601; todos los demás reactivos fueron preparados en el laboratorio y, en el caso de la solución de lavado, se preparó al instante.

Se recolectaron todos los resultados obtenidos y se realizó el ARS con ayuda del programa Minitab®. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

En el análisis ANOVA para la reducción de variables observamos que se obtiene una mejor lisis en el tubo cónico de 45 mL, sin embargo, la cantidad de muestra requerida para trabajar en este tubo es excesiva por lo que se optó por trabajar con el tubo redondeado de 4 mL, quien es el segundo mejor vs tubo Eppendorf de 1mL, 2mL y tubo cónicos de 15 mL (Fig.2).

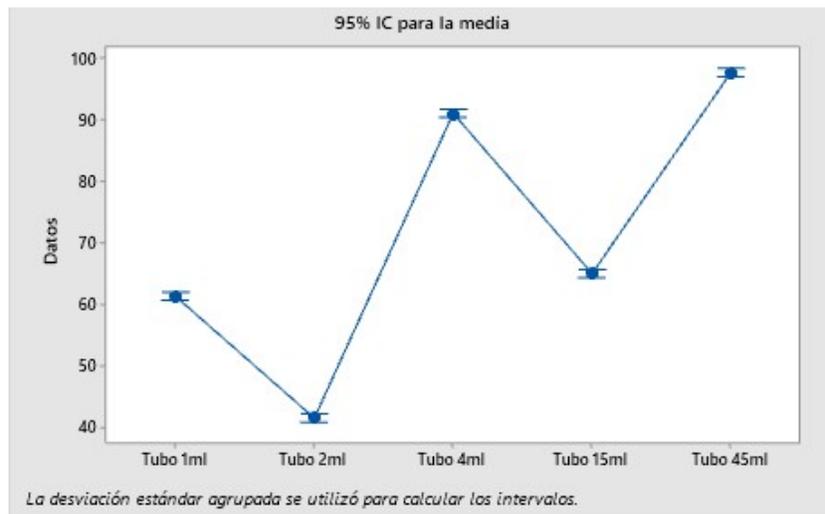


Figura 2: Análisis ANOVA de la influencia del tubo usado en la lisis eritrocitaria.

Para el análisis de los factores influyentes en la lisis eritrocitaria se probaron las condiciones descritas en la matriz, probando condiciones de volumen de solución de lisis con respecto a la muestra (14:1 y 24:1), temperatura de lisis (4°C y TA) y tiempo de lisis (10 y 15 minutos). Se determinó que los factores influyentes en este proceso son el tiempo y la dilución de lisis, así como la temperatura, teniendo mejores resultados con 15 min de lisis a TA por lo que se determina que en efecto, la eficiencia de lisis depende del volumen utilizado (Fig. 3)

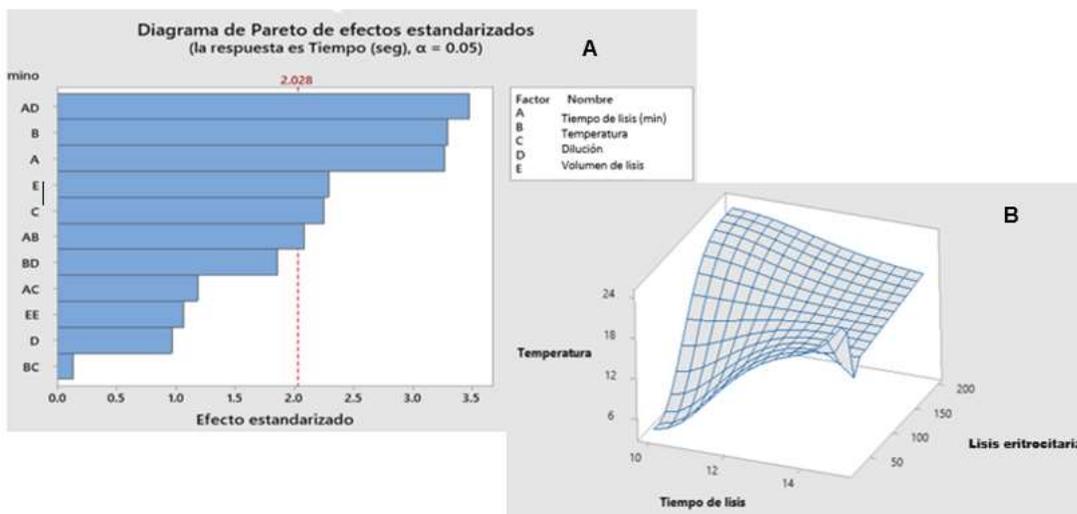


Figura 3: ARS de la lisis eritrocitaria: A) Factores influyentes, B) Gráfica de la curva de respuesta.

Para el proceso de fijación se probaron concentraciones del 2% y 4% de paraformaldehído, ya que, en diversos protocolos de anticuerpos intracelulares se manejan estas concentraciones, además se probaron tiempos de fijación de 10 y 15 min. Para este paso del proceso resultó ser altamente influyente el volumen del fijador seguido del tiempo de fijación, teniendo menor influencia la concentración de paraformaldehído (Fig. 4).

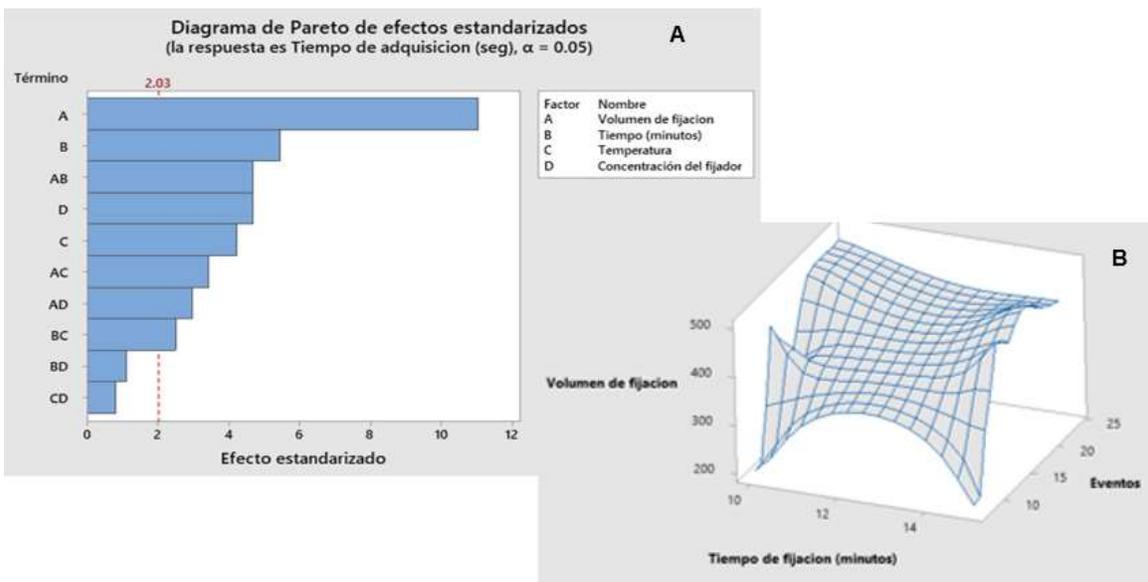


Figura 4: ARS de la fijación celular: A) Factores influyentes, B) Gráfica de la curva de respuesta.

Para la permeabilización celular se probaron condiciones del 2% y 4% de tritón. El análisis de los datos mostró que los factores influyentes de este proceso son la temperatura y el tiempo, no así la concentración del tritón (Fig. 5).

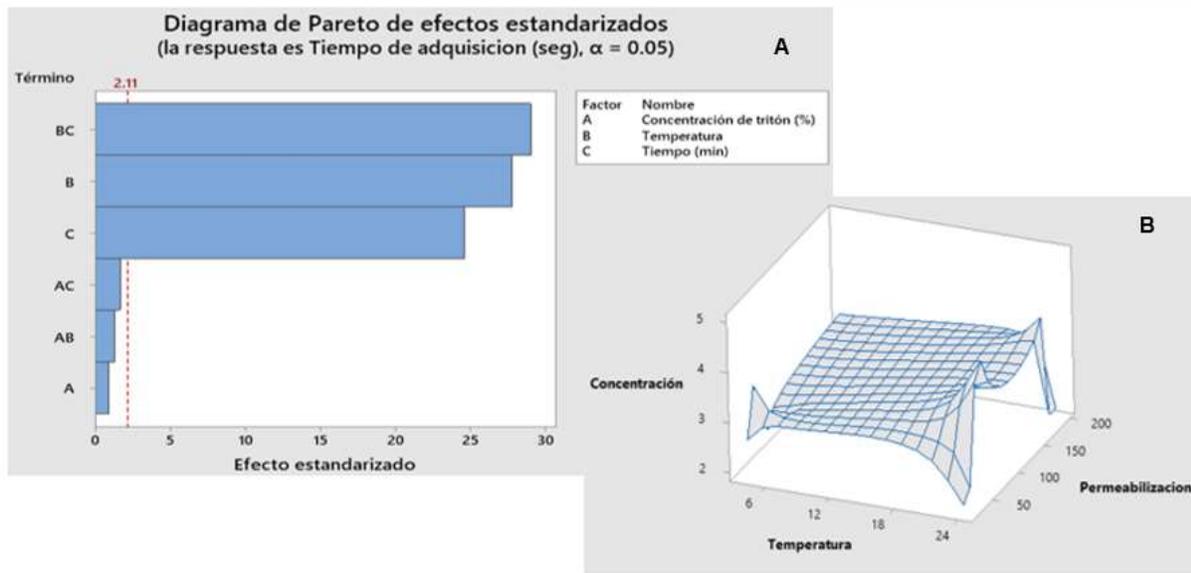


Figura 5: ARS de la permeabilización celular: A) Factores influyentes, B) Gráfica de la curva de respuesta.

Finalmente se analizó la pérdida celular debido a los lavados entre cada proceso; para ello se probaron condiciones de centrifugación a 200 y 500 xg, además del número de lavados entre cada proceso (1 y 2) ya que son recomendables dos lavados después de los procesos de fijación y permeabilización celular. Para este proceso se observa una mayor pérdida celular (del 60-70%) a 200 xg y de igual manera al aumentar el número de lavados, sin que tenga influencia la concentración de BSA en las condiciones probadas en este análisis (Fig. 6).

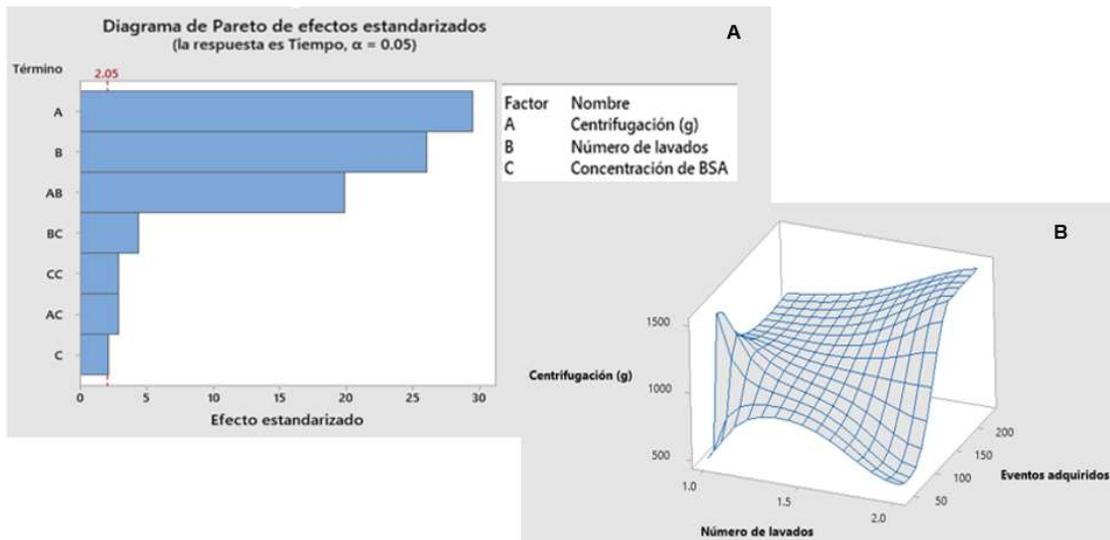


Figura 6: ARS de la pérdida celular debido a los lavados: A) Factores influyentes, B) Gráfica de la curva de respuesta.

Con todo lo anterior se realizó un análisis general de los factores más influyentes del proceso (Fig. 7), teniendo como pasos críticos de la pérdida celular, la permeabilización y los lavados entre cada proceso. Se debe tener en cuenta la temperatura y tiempo para cada variable del proceso, especialmente en la permeabilización, además de cuidar las centrifugaciones. Es necesario mencionar que tras la permeabilización son necesarios dos lavados ya que esto evita que se maltraten las células debido a remanentes del lisante en el tubo. No se observaron modificaciones en la autofluorescencia celular en ningún paso del proceso.

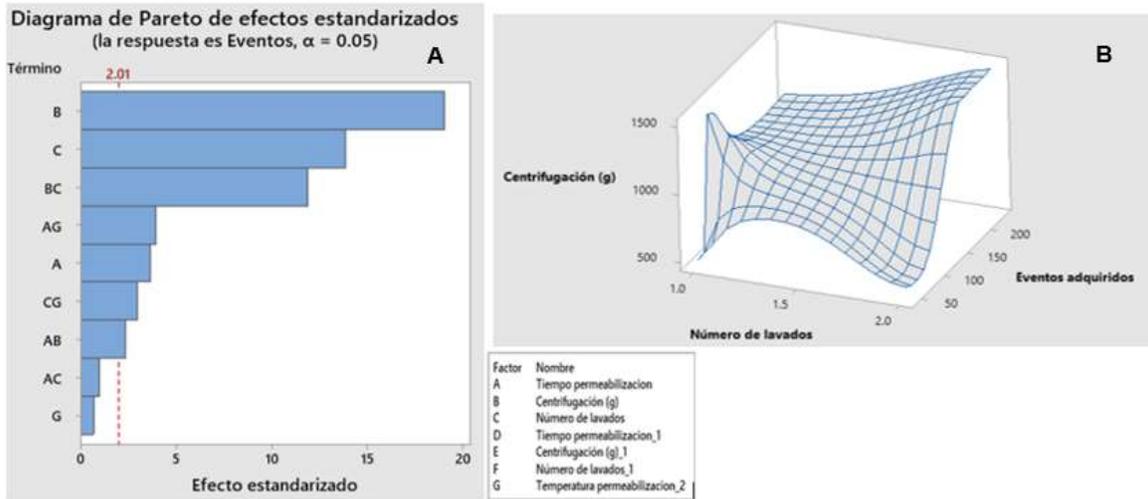


Figura 7: ARS de los factores influyentes en el proceso: A) Factores influyentes, B) Gráfica de la curva de respuesta.

De acuerdo con lo reportado por Bossuyt *et al.*⁵, se determinó además si en el proceso se modifican el tamaño celular, la distribución poblacional, la cantidad de eventos por segundo y/o la intensidad de fluorescencia. No se observó cambios en ninguna de estas características. Se observa la distribución celular clásica de los leucocitos en tamaño y complejidad, así como el marcaje de poblaciones celulares con CD45 con CD45 (Fig. 8).

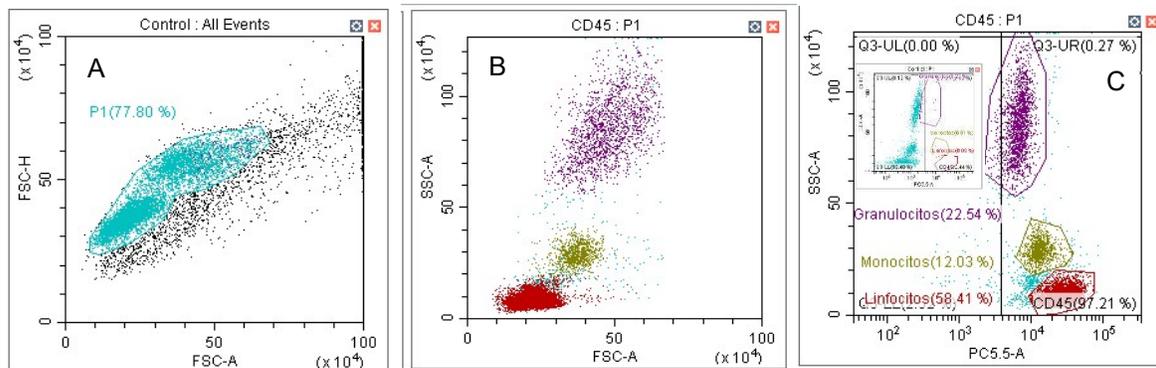


Figura 8: Distribución poblacional de linfocitos de un voluntario con el proceso obtenido del ARS. A) Selección de la población libre de dupletes, B) Distribución de las subpoblaciones celulares en base a sus características de tamaño vs complejidad, C) Distribución de las subpoblaciones celulares en base a la marcación con CD45.

CONCLUSIONES

Con el análisis de respuesta de superficie fue posible determinar las condiciones experimentales óptimas para el procesamiento de muestras de origen hemático en un análisis multiparamétrico que requiera la implementación de marcadores superficiales e intracelulares, obteniendo poblaciones definidas con una pérdida celular mínima y con una baja cantidad de dupletes. Este análisis es de gran ayuda en el establecimiento de protocolos para la implementación de nuevos marcadores celulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Soporte técnico de Minitab, Recuperado el 15 de mayo, 2020 de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/getting-started/designing-an-experiment/>.
2. D. I. Sánchez Cepillo, "Diseño Óptimo de Laminados en Materiales Compuestos. Aplicación del MEF y el Método de las Superficies de Respuesta", Tesis de Máster en Diseño Avanzado en Ingeniería Mecánica, Universidad de Sevilla, 2011, pp. 88-91.
3. P. M. Peregrina Peña, "Empleo de superficies de respuesta para la solución de problemas de inventarios estocásticos", Tesis de Licenciatura de Ingeniería Industrial, Universidad de Las Américas de Puebla, 2000, pp. 37-61.
4. Euroflow, Recuperado el 15 de mayo, 2020 de <https://euroflow.org/>.
5. X. Bossuyt, G. E. Marti, T. A. Fleisher, "Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry", *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, Vol. 30, 3, 1997, pp. 124-133.

ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE UN PRODUCTO CAPILAR CON EXTRACTO DE *OPUNTIA FICUS*

Guadalupe López Olivares, José Armando Narváez Padilla, Ana Lilia Padilla Velasco, Lidia Meléndez Balbuena, Ismael Soto López

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
guadamax@yahoo.com.mx

RESUMEN

Opuntia ficus es una planta de cactus comestible que crece en las regiones áridas y semiáridas del mundo, también conocida como higuera de palo, chumbera, nopal o palera, tuna espinosa, cactus de misión o cactus ficus además de sus usos culinarios es rica en ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, fibras, aminoácidos y compuestos antioxidantes como fenoles, flavonoides, betaxantina y compuestos antioxidantes como fenoles, flavonoides, betaxantina y betacianina.

En el presente trabajo se presenta la elaboración de un producto de uso capilar con un aditivo natural obtenido a partir del nopal que es un producto de fácil adquisición en la ciudad de Puebla y que se cosecha en grandes cantidades en los alrededores dentro del Estado. El nopal tiene propiedades hidratantes y ayuda en las irritaciones de la piel, ayuda a la renovación celular y promueve el crecimiento del cabello, por lo anterior es un ingrediente ideal para un shampoo para cabello, además de la elaboración del producto es importante realizar pruebas físicas, químicas y de funcionalidad entre otras al shampoo con extracto de *opuntia ficus* para garantizar la calidad del producto terminado.

Se realizó la extracción 100 gramos de nopal con 500ml de agua destilada colocándolo en trozos a ebullición durante quince minutos, posteriormente se retiraron los sólidos del agua y se filtró con tamiz malla 200.

Para elaborar el shampoo se procedió a pesar el lauril éter sulfato de sodio en un recipiente y agregar la amida de coco y la cocamidopropilbetaina, mezclar procurando no hacer espuma, agregar la mitad del total de agua destilada y mezclar siempre procurando no hacer espuma, aparte disolver el metil parabeno en agua destilada y agregar a la mezcla, agregar el extracto de nopal y terminar de agregar el agua restante mezclar y finalmente agregar el cloruro de sodio mezclar.

Para el control de calidad se determinó el pH y se realizaron pruebas de irritabilidad dérmica de acuerdo a la normatividad mexicana vigente.

La prueba de irritabilidad dérmica se realizó con conejos de aproximadamente 1600 gramos cada uno, de sexo indistinto, fueron rasurados un día antes de aplicar la muestra, se aplicó la muestra simultáneamente en los costados del conejo en piel intacta y en piel erosionada, cubriendo ambos costados con gasa (parche semiocluido). La observación de la piel se realizó a las 24 y 72 horas posteriores a la aplicación de la muestra.

Se elaboraron dos formulaciones de shampoo para cabello que presentan buena apariencia, hacen buena cantidad de espuma y limpian adecuadamente.

De las pruebas de control de calidad el pH de ambos shampoos se encuentran entre 7 y 8 lo cual es adecuado para utilizarse en el producto y de las pruebas de irritabilidad dérmica realizadas en conejos el resultado fue ligeramente irritante, lo cual hace al producto apto para su uso.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la industrialización es importante tener un conocimiento cabal de la composición química de las diferentes partes de la planta. Este conocimiento es indispensable para tener éxito tanto en la elección de las tecnologías de procesamiento más adecuadas que se pueden aplicar como en las condiciones de aplicación de las mismas, a fin de obtener productos inocuos, nutritivos y de alta calidad. Por lo tanto, las partes de la planta cuyas características interesa conocer mejor por sus amplias posibilidades de utilizar son los frutos y los cladodios. Las flores se consideran también, al igual que los cladodios o nopalitos, una verdura y se pueden consumir como tales.

La evolución de la composición de algunos parámetros hasta la madurez (pH, sólidos solubles, fibra) deberá ser tenida en cuenta dependiendo del proceso a que se someterá la fruta o los cladodios y más directamente al producto a que se quiera destinar.

La mayoría de los otros aditivos de *champú* no son ingredientes verdaderamente activos, que se incluyen por razones de comercialización en lugar de rendimiento. Los *shampos* anticaspa han sido un área de crecimiento en los últimos años, con varios ingredientes activos que pueden dañar la piel o provocar problemas mayores a los que se quiere eliminar al utilizarlos. Actualmente tienen mayor auge los productos para aseo personal con ingredientes naturales, entre ellos los shampoos capilares.

La elaboración de un producto con ingredientes de extractos de naturales es un aporte tanto al bienestar de las personas por su uso en si higiene tanto como el bienestar ambiental ya que muchos componentes de los productos con aditivos químicos dañan el ambiente y el ecosistema al intoxicar a especies marinas por ejemplo.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó la extracción 100 gramos de nopal con 500ml de agua destilada colocándolo en trozos a ebullición durante quince minutos, posteriormente se retiraron los sólidos del agua y se filtró con tamiz malla 200.

Para elaborar el producto capilar se utilizaron los ingredientes que se muestran en la tabla número 1.

Ingrediente
Lauril éter sulfato de sodio
Amida de coco
Cocamidopropilbetaina
Metil parabeno
Extracto de nopal
Aroma
Cloruro de sodio
Agua destilada

Tabla número 1. Ingredientes de la formulación de shampoo.

El procedimiento que se siguió es el siguiente:

Pesar el lauril éter sulfato de sodio en un recipiente y agregar la amida de coco y la cocamidopropilbetaina, mezclar procurando no hacer espuma, agregar la mitad del total de agua destilada y mezclar siempre psocurando no hacer espuma, aparte disolver el metil parabeno en agua destilada y agregar a la mezcla, agregar el extracto de nopal y terminar de agregar el agua restante mezclar y finalmente agregar el cloruro de sodio mezclar. En la imagen 1 se muestran los ingredientes y el producto terminado.



Imagen 1. Ingredientes y producto terminado

Se elaboraron dos productos variando únicamente la cantidad del extracto disminuyendo la cantidad de agu destilada como se muestra en la tabla número 2.

Ingrediente	Cantidad Formulación 1	Cantidad Formulación 2
Lauril éter sulfato de sodio	25.0 %	25.0 %
Amida de coco	5.0 %	5.0 %
Cocamidopropilbetaina	5.0 %	5.0 %
Metil parabeno	1.0 %	1.0 %
Extracto de nopal	10.0 %	15.0 %
Aroma	1.0 %	1.0 %
Cloruro de sodio	3.0 %	3.0 %
Agua destilada	50.0 %	50.0 %

Tabla número 2. Ingredientes de las dos formulaciones de shampoo.

Para el control de calidad se determinó el pH y se realizaron pruebas de irritabilidad dérmica de acuerdo a la normatividad mexicana vigente.

La prueba de irritabilidad dérmica se realizó con conejos de aproximadamente 1600 gramos cada uno, de sexo indistinto, fueron rasurados un día antes de aplicar la muestra, se aplicó la muestra simultáneamente en los costados del conejo en piel intacta y en piel erosionada, cubriendo ambos costados con gasa (parche semiocluido). La observación de la piel se realizó a las 24 y 72 horas posteriores a la aplicación de la muestra.

RESULTADOS

Se elaboraron dos formulaciones de shampoo para cabello que presentan buena apariencia, hacen buena cantidad de espuma y limpian adecuadamente.

De las pruebas de control de calidad el pH de ambos shampoos se encuentran entre 7 y 8 lo cual es adecuado para utilizarse en el producto y de las pruebas de irritabilidad dérmica realizadas en conejos el resultado se muestra en la tabla 3, 4 y 5.

Reaccion cutanea eritema	Conejo 1				Conejo 2			
	24 horas		72 horas		24 horas		72 horas	
Condiciones del parche	D	I	D	I	D	I	D	I
Piel intacta	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel erosionada	0	1	0	0	1	1	0	0

Tabla 3. Resultado de irritabilidad dérmica en conejos

Reaccion cutanea eritema	Conejo 3				Conejo 4			
	24 horas		72 horas		24 horas		72 horas	
Condiciones del parche	D	I	D	I	D	I	D	I
Piel intacta	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel erosionada	1	1	0	0	0	1	0	0

Tabla 4. Resultado de irritabilidad dérmica en conejos

Grado de irritación:	0.500
Interpretación:	No irritante
Observación:	Probablemente inocuo en contacto con la piel.

Tabla 5. Interpretación de resultados de irritabilidad dérmica en conejos

CONCLUSIONES

El producto elaborado en el ensayo de irritabilidad dérmica en conejos tuvo como resultado no irritante lo cual favorece al producto, debido a lo anterior fue probado por dos personas sin provocar

ninguna reacción adversa en la piel ni en el cabello, sin embargo es necesario realizar otros ensayos como el de irritabilidad ocular en conejos y de sensibilidad para poder realizar un ensayo con una muestra representativa de voluntarios, no obstante el producto final presentar buen aspecto, no requiere de aplicación de colorante y es estable a condiciones ambientales hasta por ocho meses presentando buena apariencia transcurrido ese tiempo manteniéndolo en condiciones adecuadas de almacenamiento es decir en lugar fresco, seco y sin recibir rayos solares directamente. Dentro de las propiedades observadas al aplicarlo en las dos personas proporciona sedosidad al cabello y elimina resequedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmacopea de los estados unidos mexicanos sexta edición. MGA 0515 Irritabilidad en piel.
2. Villegas y de Gante M. 1997. Los Nopales (Opuntia spp.) recursos simbólicos tradicionales en México. pp 271-273.
3. Carmen Sánchez. 2007. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas de la FAO 162. pp 9

PRIMER REGISTRO DE UNA COLONIA DE *LEPTONYCTERIS NIVALIS* EN LA MINA EN SANTA ROSA I, MUNICIPIO DE MAZAPIL, ZACATECAS

¹Bárbara Vargas Miranda, ²Demetrio Ambriz García, ²Alfredo Trejo Córdova, ³Luis Deyvi García-González, ⁴Esteban Vieyra Vargas, ²María del Carmen Navarro Maldonado, ⁵Cynthia Elizalde-Arellano, ⁵Juan Carlos López-Vidal

¹Departamento de Ciencias de la Salud. ²Departamento de Biología de la Reproducción Animal. ³Licenciatura en Producción Animal. ⁴Licenciatura en Biología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186 Vicentina, Iztapalapa, 09340. Ciudad de México, Ciudad de México. ⁵Laboratorio de Cordados Terrestres, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, Ciudad de México, Código Postal 11340, México. bvm@xanum.uam.mx

RESUMEN

El murciélago magueyero filostómido *Leptonycteris nivalis*, se distribuye desde Texas y Nuevo México hasta Guatemala. Su alimentación consiste principalmente en néctar y polen, por lo cual realiza migraciones estacionales en la búsqueda de estos recursos florísticos (Fleming *et al.*, 1993; Rojas-Martínez *et al.*, 2004). Utiliza minas y cuevas para formar grandes colonias de maternidad, por lo que la pérdida de refugios constituye una amenaza para la especie. Actualmente se encuentra en la lista roja de la UICN, como especie amenazada. En el presente trabajo se registra por primera vez la presencia de una colonia de *L. nivalis* en la Mina abandonada "En Santa Rosa I", Municipio de Mazapil, Zacatecas. En dicha mina se estimó la densidad poblacional con la metodología de "conteo visual en la salida", donde se colocaron cuatro personas, dos a cada lado de la boca de la mina. El conteo fue cada 30 segundos y desde las 21:10 h a las 21:46 h. Se estimó la salida de 97 murciélagos en un minuto. De las 21:38 a las 21:40 h se registró el mayor número de murciélagos que salían. Por otro lado, se estimó la cantidad de murciélagos perchedos en el interior de la mina a través del método de "estimación directa". En una superficie de 195 m² se estimó 8,775 murciélagos perchedos. Por lo tanto, la estimación integrada en la mina fue de 14,000 individuos aproximadamente. Este registro de *L. nivalis* para Zacatecas fue en el mes de junio, y coincide con un mayor disponibilidad de alimentos, ya que en verano se presenta un régimen de lluvias que resulta en floración de yucas y agaves. Las migraciones de este género están estrechamente relacionadas con el florecimiento de las plantas que le sirven de alimento y la disponibilidad de las mismas.

INTRODUCCIÓN

El murciélago magueyero mayor u hocicudo grande, *Leptonycteris nivalis* pertenece a los glosófagidos y es considerado como polinizador primario de magueyes y de cactáceas columnares (Arita, 1991). Esta especie es conocida desde el sur de Estados Unidos al norte de Arizona, sur de Nuevo México y oeste de Texas, hasta el sur de México y Guatemala (Simmons, 2005). Se encuentra en tierras bajas entre los 1000 y los 2200 msnm aunque se registró una colonia a los 3780 msnm (Koestner, 1941; Hall, 1981; Pfrimmer y Wilkins, 1988; Arita, 1991; Reid, 1997). Habita principalmente cuevas, túneles y minas abandonadas (Hensley y Wilkins, 1988; Arita, 2005). Su alimentación consiste en polen y néctares de algunos magueyes, convolvuláceas, bombacáceas y cactáceas (Carter y Jones, 1978; Fleming *et al.*, 1993; Sánchez y Medellín-Arollo, 2007). Las migraciones de este género de murciélagos están estrechamente relacionadas con la floración y disponibilidad de las plantas que le sirven de alimento (Álvarez *et al.*, 1999; Medellín *et al.*, 2009) y coincide en la época reproductiva donde hay una mayor disponibilidad de recursos alimenticios. Registros de *Leptonycteris nivalis* en México reportan hembras preñadas en marzo y abril, crías y hembras lactantes en junio y julio (Moreno-Valdez *et al.*, 2004).

Este murciélago magueyero mayor es una especie migratoria que regresa a su lugar de nacimiento en alguna época del año, fenómeno conocido como filopatría (Medellín *et al.*, 2009). Durante su migración al sur de México, las cuevas y minas abandonadas son utilizadas frecuentemente como un refugio para esta especie, que lo utilizan como sitio de descanso, reproducción y refugio de maternidad, entre otras cosas (Ceballos y Oliva, 2005). Esta especie se encuentra listada bajo la categoría de riesgo 'Amenazada' (A) en la NOM-059-SEMARNAT-2018 (Diario Oficial de la

Federación, 2018) y en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie en peligro de Extinción, debido a la pérdida de sus refugios (Medellín, 2016). Estudiar la densidad poblacional de organismos, nos permite conocer la cantidad de individuos de una especie que existe en determinada área, en el caso de los murciélagos su densidad en una cueva considera que tan estable se encuentra la población quiropterológica dentro de un ecosistema (Corso *et al.*, 2012).

Existen varios métodos para estimar la densidad poblacional en murciélagos. Uno es contar directamente el número de murciélagos perchados en un área determinada (metros cuadrados); otro es contar el número de individuos que salen de la cueva al atardecer en un determinado tiempo, para ello se utilizan videocámaras colocadas a un costado de la entrada de la cueva y un fondo contrastante filmando la salida de los murciélagos, para después contabilizarlos por intervalo de tiempo (en este caso por minutos) y graficar la densidad (Rizo-Aguilar *et al.*, 2015).

Los murciélagos del género *Leptonycteris* que durante el verano migran, ocupando el norte de México y sur de los Estados Unidos, se concentran en colonias de cientos o miles de individuos en cuevas o minas abandonadas. Numerosos estudios se han realizado con la finalidad de estimar la densidad poblacional del género *Leptonycteris*. En Texas, Estados Unidos en la cueva “Emory” del parque Big Bend, se registró una densidad poblacional de *Leptonycteris nivalis* de aproximadamente 10,650 a 13,650 murciélagos (Easterla, 1972). En la Cueva del Diablo en Morelos, México, se estimó el tamaño de la población de *Leptonycteris nivalis* de 8,00 a 10,000 individuos (Medellín, 2003). En la cueva El Infierno, Nuevo León, México, se registraron unos pocos miles de individuos (Moreno-Valdez *et al.*, 2004). En Baja California se registró una colonia de *Leptonycteris curasoae* por primera vez, de 6,192 a 12,384 individuos (Guevara-Carrizales *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo fue registrar una nueva colonia de *Leptonycteris nivalis* en la “Mina de Santa Rosa I” ubicada dentro del Municipio de Mazapil, al Noreste del Estado de Zacatecas.

METODOLOGÍA

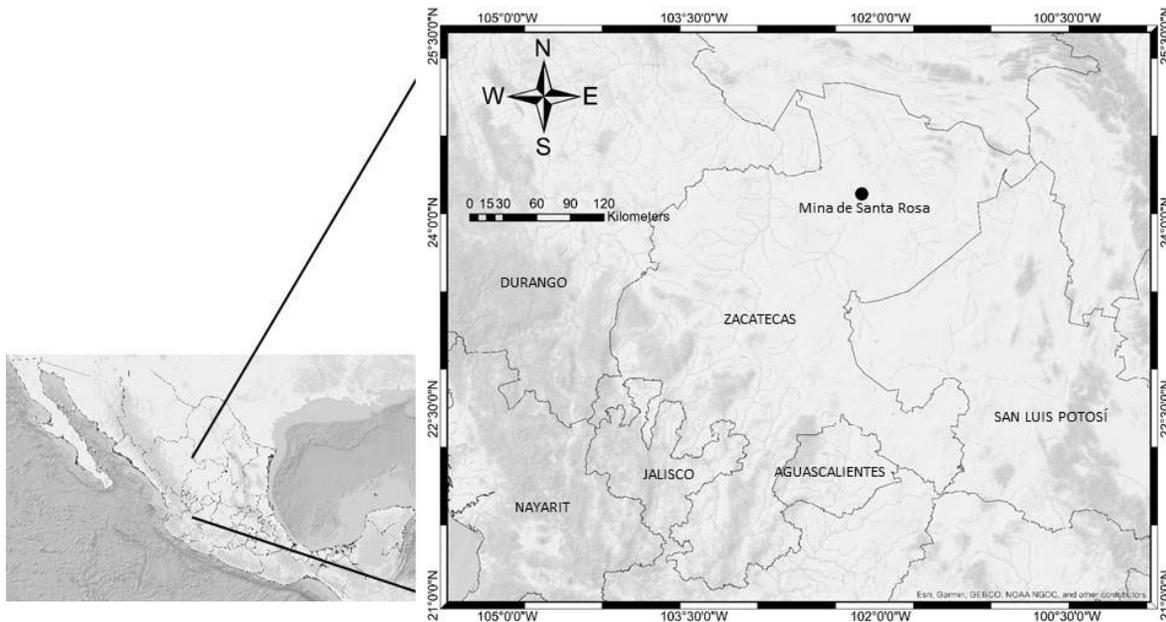
Área de estudio

La “Mina de Santa Rosa” se ubica dentro del Municipio de Mazapil, al Noreste del Estado de Zacatecas, México, a los 2230 msnm. Se ubica entre los 24°13'42" latitud Norte y 102°09'06" longitud Oeste (Figura 1). La vegetación dominante corresponde a bosque templado de *Pino-Cupresus* (Rzedowski, 1978). La entrada de la mina mide 7.5 metros de ancho y 4.5 metros de altura (Figura 3), que conduce a una bóveda o sitio de percha nocturna de aproximadamente 13 m de ancho y 15 m de altura, seguido por tres caminos que se bifurcan más adelante, algunos imposibilitados para entrar.

Muestreo

Se realizaron tres visitas a la mina: 10 de junio de 2013 (muestreo 1), 11 de junio de 2013 (muestreo 2) y 31 de agosto de 2013 (muestreo 3). Durante las visitas a la mina se colocó una red de nylon de 2.5 x 6 m ubicada en la entrada principal. A los murciélagos capturados se les determinó el sexo y se identificaron mediante las claves de identificación para murciélagos (Medellín *et al.*, 2008). Los individuos de la especie *Leptonycteris nivalis* se pesaron con una pesola de 300 g por 2 g (precisión ± 0.1 mm) y se tomaron las siguientes medidas convencionales: longitud total, longitud del antebrazo, longitud de pata, longitud de oreja derecha, todas ellas expresadas en milímetros (precisión ± 0.1 mm). Se registró el sexo y el estado reproductivo de las hembras (no reproductivas, gestantes o post-lactantes) y los machos (sin testículos agrandados o reproductivos), posteriormente fueron liberados. Se determinó la edad relativa mediante el grado de osificación de las placas de crecimiento de las epífisis de las falanges, esto se observó poniendo a contra luz las falanges del tercer dedo de las alas (Rojas *et al.*, 2001).

Figura 1. Localización del área de estudio y del sitio muestreado.



Estimación de la densidad

Esta se realizó por dos métodos, el primero fue con base en la medida del área de cobertura de percha (McCracken, 2003). El área de percha se calculó midiendo la superficie del suelo, debido a que, donde perchan se encontraba a una altura de 8 a 15 m y no era accesible para medirla. Se contaron los individuos perchados y se verificó el conteo con fotografías (Figura 2). Se consideró que la densidad de murciélagos por pie cuadrado (ft^2) fue de 50 a 100 individuos (Fleming *et al.*, 2003). El segundo fue estimando siguiendo la metodología de Rizo-Aguilar *et al.* (2015), donde se cuenta el número de individuos que salen de la mina. Para ello se identificaron todas las posibles salidas de la mina y evitar pérdida de información o subestimación del número de individuos. Se colocaron tres y/o cuatro personas en la salida de la cueva, con la finalidad de tener la mejor visibilidad posible y realizar un conteo apegado a la realidad. Se contó el número de individuos que salieron de la cueva distinguiendo sus siluetas a contraluz o luz roja por 30 segundos, con intervalos de 30 segundos. El conteo terminó cuando se observó que algunos individuos regresaban a la mina, esto con la finalidad de evitar sobrestimar la población. El conteo inició a las 21:10 h.

Figura 2. Ejemplar de la especie *Leptonycteris nivalis* fotografiado en la Mina.

RESULTADOS

La mina contaba con lugares no accesibles y se observó que *Leptonycteris nivalis* se refugiaba preferentemente en estos lugares, además el lugar contaba con una bóveda, un lugar distinto en donde perchar antes de salir en las noches (Figura 3). La mina alberga en mayor proporción la especie *Leptonycteris nivalis*, pero además se registraron las especies *Corynorhinus townsendii*, *Idionycteris phyllotis*, *Myotis ciliolabrum*, *Myotis thysanodes*, *Myotis velífera* y *Tadarida brasiliensis*, por lo que estos refugios son denominados multiespecie, que albergan varias especies de murciélagos.

Figura 3. Entrada de la "Mina de Santa Rosa" ubicada dentro del Municipio de Mazapil, Zacatecas, México.



Los muestreos iniciaron en cuanto se vio que salía una cantidad considerable de murciélagos. El muestreo 1 inició a las 21:10 h y terminó a las 21:46 h, debido a que se observaban individuos que regresaban y para no sobreestimar la densidad poblacional. Se contaron 413.3 murciélagos en 60 segundos, es decir que salieron de la mina 0.63 murciélagos por segundo; siendo el mayor número de murciélagos que salieron entre las 21:12 h y 21:12:30 h (59.33 murciélagos/30 segundos) (Figura 4a). El muestreo 2 inició a las 21:10 h y terminó a las 21:37 h, se consideró contar por más tiempo hasta que el número de individuos que salieran fuera proporcional a los que entraban. Se contaron 1,803 murciélagos en 1,620 segundos, es decir que salían de la mina 1.11 murciélagos por segundo; el mayor número de murciélagos que salieron fue entre las 21:18:00 y 21:18:30 h (108.67 murciélagos/30 segundos) (Figura 4b).

El muestreo 3 inició a las 21:10 h y terminó a las 21:31:00 h, se consideró contar en más tiempo hasta que el número de individuos que salían era proporcional a los que entraban. Se contaron 2,154.67 murciélagos en 1,260 segundos, es decir salían de la mina 1.71 murciélagos por segundo; el mayor número de murciélagos que salieron fue entre las 21:11:00 y 21:11:30 h (155.67 murciélagos/30 segundos) (Figura 4c).

Al combinar las tres muestras se observó un incremento de salida de individuos de la mina entre las 21:18:00 h y 21:25:00 h, así como a las 21:18:00 h, (Figura 5), encontrando una diferencia significativa entre el número de individuos que salen en junio y agosto ($X^2 = 370$, 50 g.l., $P < 0.05$).

Se colectaron 17 ejemplares de *Leptonycteris nivalis*, cuatro hembras y 13 machos. Los machos colectados en junio, presentaban los testículos escrotados, mientras que las hembras aparecían gestantes o lactando. Su peso promedio fue de $\bar{x} = 33.06$ g (± 2.99) y el antebrazo en promedio midió 56.30 mm (± 3.79) (Cuadro 1).

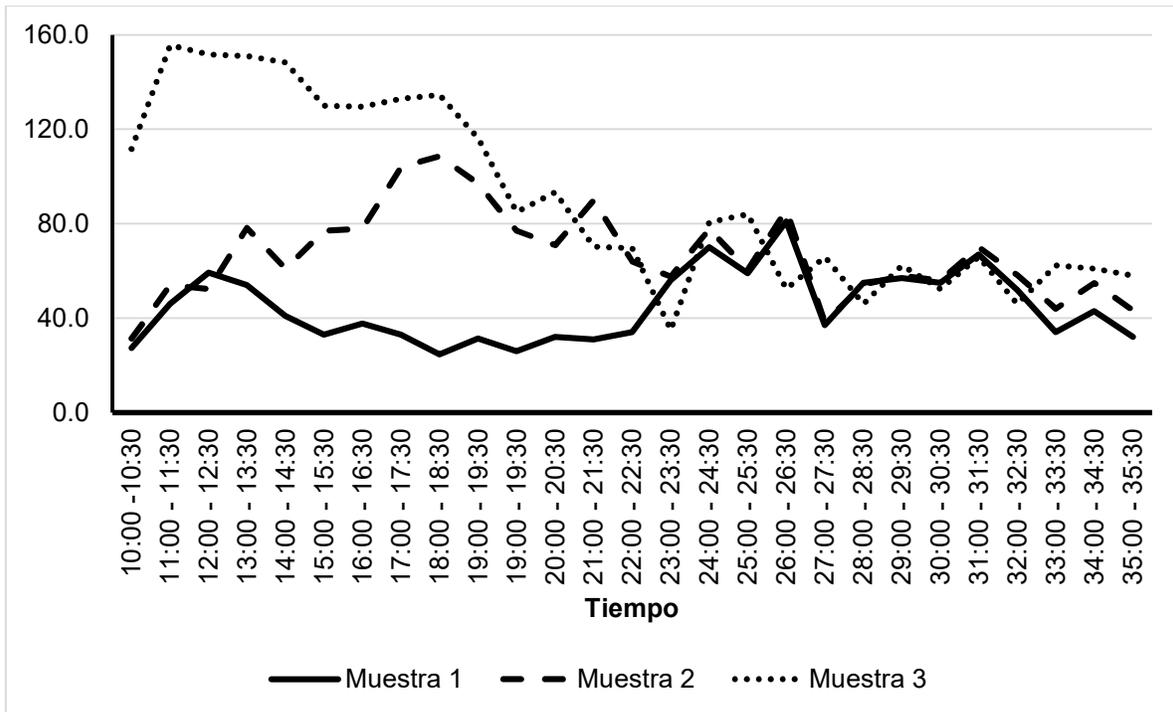
La estimación por cobertura de área de murciélagos perchedos se obtuvo por promedio en ambos muestreos, siendo de 50 murciélagos por metro cuadrado con un área total de percha de 195 m². Al extrapolar el número de individuos por metro cuadrado con el área total de percha en la mina, se

Figura 4. a) Patrón del muestreo 1 de la salida de los murciélagos *Leptonycteris nivalis* en la “Mina de Santa Rosa” en el Municipio de Mazapil, Zacatecas, México, que inició a las 21:10:00 y terminó a las 21:19:30 h. b) Patrón del muestreo 2, que inició a las 21:10:00 h y terminó 21:35:30 h. c) Patrón del muestreo 3, que inició a las 21:10:00 h y terminó 21:29:30 h. En las gráficas se ve el conteo hasta las 21:35:30, pues se siguió registrando mientras se observó que salían.





Figura 5. Conjunto de datos combinados de la figura 4 a. b y c. Muestra 1 de la salida de los murciélagos *Leptonycteris nivalis* en la “Mina de Santa Rosa” en el Municipio de Mazapil, Zacatecas, México, que inició a las 21:10:00 y terminó a las 21:19:30 h. Muestra 2, que inició a las 21:10:00 h y terminó 21:35:30 h. Muestra 3, que inició a las 21:10:00 h y terminó 21:29:30 h. En la gráfica se ve el conteo hasta las 21:35:30, pues se siguió registrando mientras se observó que salían.



registró una densidad poblacional relativa de 8,755 murciélagos. Por lo tanto, la estimación integrada en la mina fue de 14,000 individuos aproximadamente.

Todos los ejemplares capturados eran adultos, pues el grado de osificación de las placas de crecimiento de las epífisis de las falanges del tercer dedo de las alas mostró que la osificación de las falanges estaba completa (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La especie *Leptonycteris nivalis* es una especie migratoria durante el verano, ocupando la parte más norteña de su distribución en el norte de México, donde las hembras gestantes llegan a estas regiones para alimentarse y tener mayores probabilidades de sobrevivencia de sus crías. Estudios muestran que estos murciélagos copulan en invierno y el desarrollo del feto se realiza durante la migración (Medellín *et al.*, 2008). En este estudio se encontraron en el mes de junio hembras gestantes o lactantes y machos con testículos escrotados, datos similares a los de otros estudios (Moreno-Valdez *et al.*, 2004).

Esta especie está considerada en peligro de extinción por la UICN y por el Gobierno de los Estados Unidos (Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos, 1994). En México está considerada como una especie Amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2010), por lo tanto es muy importante registrar las colonias de esta especie, pues se ha documentado que se agrupa en cuevas o minas abandonadas en miles o cientos de miles de individuos. Sin embargo, es una especie que fácilmente deja sus refugios si son molestados continuamente por el humano, por lo que sus poblaciones han declinado de manera alarmante en las últimas décadas (Hutson *et al.*, 2001), aunado a la amenaza constante de la destrucción de su hábitat, ya que la especie, al migrar a México busca recursos para sus crías, por ende, el daño es mayor, pues *Leptonycteris nivalis* depende de la conservación de su hábitat de verano al norte de México (Medellín *et al.*, 2008). Por cual es importante monitorear sus colonias y aportar evidencia cuantitativa de si existen reducciones poblacionales de la especie.

La colonia registrada en este estudio fue mayor a 8,000 murciélagos en junio y agosto y se observó la floración de agaves de la especie *Yucca carnerosana*. En el norte de la distribución de *Leptonycteris nivalis*, varias especies de agave son la principal fuente de alimento para este murciélago (Fleming 2004; Moreno-Valdez *et al.*, 2004). En otros estudios se han reportado colonias de 4,000 individuos en el norte de México de abril a octubre y estaba altamente correlacionada con la disponibilidad de agave floreciente cercano (Moreno-Valdez *et al.*, 2004; Sánchez y Medellín-Arrollo, 2007).

Cuadro 1. Ejemplares de *Leptonycteris nivalis* capturados en La “Mina de Santa Rosa”, ubicada dentro del Municipio de Mazapil, al Noreste del Estado de Zacatecas, México. H = Hembra, M = Macho.

	FECHA	EDAD APROXIMADA	SEXO	REPRODUCTIVO	PESO (gramos)	ANTEBRAZO (mm)	OREJA (mm)	PATA (mm)
1	10/06/13	Adulta	H	Lactando	35	43.77	26.84	5.8
2	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	35	58.24	13.41	13.31
3	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	33	56.17	12.07	13.73
4	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	35	58.24	17.02	14.06
5	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	34	57.08	16.65	15.09
6	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	36	58.86	16.39	14.73
7	10/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	35	58.66	16.27	15.2
8	10/06/13	Adulto	M	Inactivo	27	57.03	12.13	13.45
9	10/06/13	Adulto	M	Testículos sin escrotar	34	59.37	10.3	8.48
10	11/06/13	Adulta	H	Prefiada	32	56.83	16.17	15.41
11	11/06/13	Adulta	H	Receptiva	29	57.09	14.66	10.59
12	11/06/13	Adulta	H	Inactiva	30	58.88	16.65	14.07
13	11/06/13	Adulta	H	Prefiada	30	50.49	12.18	13.02
14	11/06/13	Adulto	M	Testículos escrotados	36	55.65	18.51	13.48
15	31/08/13	Adulto	M	Testículos descendiendo	37	56.49	12.11	12.3
16	31/08/13	Adulto	M	Testículos descendiendo	35	57.23	16.14	11.47
17	31/08/13	Adulto	M	Testículos descendiendo	29	56.94	14.93	12.37
				PROMEDIO	33.06	56.30	15.44	12.74

El comportamiento de los murciélagos es uno de los aspectos más estudiados, su actividad de alimentación nocturna es una de las propiedades más registradas (Jones y Rydell 1994). El tiempo, patrón y cantidad de individuos que salen de sus refugios por la noche variará entre especies y sitios de descanso. Para la estimación del tamaño de las colonias de murciélagos pueden utilizarse varios métodos para conocer la densidad poblacional, como el de “conteo visual en la salida” y el método de “estimación directa”, que proporcionan información útil para la investigación adicional sobre numerosos aspectos de su ecología, incluidas las relaciones de presas depredadoras, la dispersión de semillas, la ecología, el comportamiento de la comunidad y los patrones de alimentación (Hristov *et al.*, 2010). La salida de los murciélagos de sus refugios tendrá un patrón similar, siendo que, salir en grandes grupos es un comportamiento anti depredador, y el número de murciélagos que emergen de su refugio variará a lo largo de la noche. Estas son técnicas no invasivas con poca probabilidad de perturbar a la colonia o la salida (Kunz *et al.*, 2009).

Algunos estudios han señalado que las especies tropicales generalmente emergen antes que las especies de zonas templadas, un poco antes del atardecer, porque el crepúsculo es más corto. Además se ha observado un patrón en el que emergen murciélagos insectívoros primero, seguidos por los alimentadores de polen/néctar y luego por los frugívoros (Jones y Rydell, 1994). Lo que se

corroborar en este estudio con la captura, primero, de las especies *Corynorhinus townsendii*, *Idionycteris phyllotis*, *Myotis ciliolabrum*, *Myotis thysanodes*, *Myotis velífera* y *Tadarida brasiliensis* especies insectívoras, seguido de *Leptonycteris nivalis* murciélago nectívoro.

CONCLUSIONES

Se registró por primera vez la densidad poblacional de *Leptonycteris nivalis* en la “Mina de Santa Rosa”, Mpio Mazapil, Zacatecas, en verano del 2013. El área total de percha en la mina se registró una densidad poblacional relativa de 8,775 murciélagos y la estimación integrada en la mina fue de 14,000 individuos aproximadamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez T., Sánchez-Casas N. Villalpando J. A. 1999. Registro de los movimientos de *Leptonycteris yerbabuenae* en el centro de México. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, 45:9-15.
2. Arita H. T. 1991. Spatial segregation in long-nosed bats, *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae*, in México. Journal of Mammalogy, 72:706-714.
3. Arita H. T. 2005. *Leptonycteris nivalis* Miller, 1900. En Ceballos, G. y G. Oliva. (coords). Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura Económica, México. Ciudad de México. 233-234 pp.
4. Carter, D. C. y J. K. Jones, J. R. 1978. Bats from the Mexican state of Hidalgo. Occasional Papers, The Museum, Texas Tech University 54:1-12.
5. Ceballos, G. y G. Oliva. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Fondo de Cultura Económica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
6. Corso, A. E., J. B. Woolley y T. E. Lacher. 2012. Using digital photography and image analysis software to estimate the emergence of bats at Tou Santi Cave, Dominica, West Indies. Caribbean Journal of Science, 46: 169-175.
7. Diario Oficial de la Federación. 2018. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 30 de diciembre de 2010, segunda sección, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
8. Easterla, D. A. 1972. Status of *Leptonycteris nivalis* (Phyllostomatidae) in Big Bend National Park, Texas. Southwestern Naturalist 17:287-292.
9. Fleming, T. H., R. Núñez y L. Lobo. 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. Oecologia. 94:72-75.
10. Fleming, T. H., T. Tibbitts, Y. Petryszyn y V. Dalton. 2003. Current status of pollinating bat in southwestern North America. En Monitoring trends in bat populations of the United States and territories: problems and prospects, T. J. O’Shea y M. A. Bogan, (eds.). Biological Resources Discipline, Information and Technology Report. USGS Fort Collins Science Center. p. 63-67.
11. Fleming, T. H. 2004. “Nectar corridors: migration and the annual cycle of Lesser Long-nosed Bats.”. En *Conserving migratory pollinators and nectar corridors in western North America*, Edited by: Nabhan, G. P. 23-42. Tucson: University of Arizona Press.
12. Guevara-Carrizales A., Martínez-Gallardo R. y Moreno- Valdez A. 2010. Primer registro de una colonia de *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae) en Baja California, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 81: 583- 585.
13. Hall, E. R. 1981. The Mammals of North America. John Willey and Sons. New York, EE.UU.
14. Hensley, A. P., y K. T. Wilkins. 1988. *Leptonycteris nivalis*. Mammalian Species 307:1-4.
15. Hutson, A. M., S. P. Mickleburgh y P. Racey (eds.). 2001. Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Chiroptera Specialist Group, Gland and Cambridge. 258 p.

16. Jones, G., y J. Rydell. 1994. Foraging strategy and predation risk as factors influencing emergence time in echolocating bats. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B. Biological Sciences* 67:445–455.
17. Koestner, E. J. 1941. An annotated list of mammals collected in Nuevo León, Mexico, in 1938. *The Great Basin Naturalist*, 2: 9-15.
18. Kunz, H.T., M. Betke, N.I. Hristov y M.J. Vonhof. 2009. Methods for assessing abundance of bats. Pp. 133–157. En: Kunz, T.H. y S. Parsons (eds.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, MD.
19. McCracken, G. F. 2003. Estimates of population size in summer colonies of Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). In *Monitoring trends in bat populations of the United States and territories: problems and prospects*, T. J. O'Shea y M. A. Bogan, (eds.). Biological Resources Discipline, Information and Technology Report, USGS Fort Collins Science Center. p. 21–30.
20. Medellín R. A., Héctor T. A. y O. Sánchez H. 2008. Identificación de los murciélagos de México. Segunda edición. Instituto de Ecología, UNAM. 79 pags.
21. Medellín, R. 2016. *Leptonycteris nivalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T11697A22126172. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T11697A22126172>. Revisado el 14 enero de 2020.
22. Medellín, R. A. 2003. Diversity and conservation of bats in Mexico: research priorities, strategies, and actions. *Wildlife Society Bulletin* 31:87-97.
23. Medellín, R. A., A. Abreu-Grobois, M.C. Arizmendi, E. Mellink, E. Ruelas, E. Santana C., J. Urbán y E. Inigo-Elías. 2009. Conservación de especies migratorias y poblaciones transfronterizas. Pp. 459–515 in *Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México.
24. Moreno-Valdez, A., Honeycutt, R. L. y Grant, W. E. 2004. Colony dynamics of *Leptonycteris nivalis* (Mexican Long-nosed bat) Related to Flowering agave in Northern Mexico. *Journal of Mammalogy*, 85(3):453–459.
25. Pfrimmer H.A. y Wilkins K. 1988. Mamalian Species, *Leptonycteris nivalis*. *The American Society of Mammalogists*. N° 307, pp.1-4.
26. Reid, A. F. 1997. *A field guide to the mammals of Central America and Southeast Mexico*. Oxford University Press. New York. 334 p.
27. Rizo-Aguilar A., L. G. Ávila-Torresatón, L. Fuentes V., A. C. Nuñez L., G. I. Flores N., y S. Albino M. 2015. Capítulo 8. Técnicas para el estudio de murciélagos. En: Gallina-Tessaro S, López-González C (eds). *Manual de técnicas para el estudio de la fauna*. INECOL/UAQ. Querétaro, México. pp: 163-188.
28. Rojas A., O. García y M. Morales. 2001. Variación anual de la estructura de edades y de la actividad reproductora del murciélago nectarívoro *Leptonycteris curasoae*, en la Cueva del Obispo, ubicada en Oaxaca, México. *Dialnet, Biología*, 33-40.
29. Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 pps.
30. Sánchez, R. y Medellín-Arrollo, R. 2007. Food habits of the threatened bat *Leptonycteris nivalis* (Chiroptera: Phyllostomidae) in a mating roost in Mexico, *Journal of Natural History*, 41:25-28, 1753-1764, DOI: [10.1080/00222930701483398](https://doi.org/10.1080/00222930701483398)
31. Simmons, N. B. 2005. Chiroptera. Pp. 312-529 En *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Eilson y D. M. Reeder, eds.). Tercera edición. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

IMPLEMENTACIÓN DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPECIES DE MAMÍFEROS EN LA UAM-I

José Roberto Vázquez Avendaño¹, Demetrio Alonso Ambríz García¹, Bárbara Vargas Miranda², Alfredo Trejo Códova¹ y María del Carmen Navarro Maldonado¹

¹Departamento de Biología de la Reproducción, ² Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. robertmizer@gmail.com

RESUMEN

Los Bancos de Germoplasma (BG) son lugares donde se resguarda el genoma de diferentes especies, tales como: gametos, células somáticas, embriones y tejidos. La finalidad de conservar el material biológico es evitar la pérdida de la diversidad genética de especies silvestres amenazadas y especies domésticas de valor productivo. Mediante la aplicación de biotecnologías reproductivas se pueden obtener embriones o individuos que garanticen la sobrevivencia de especies silvestres o contribuir en los programas de mejoramiento genético de animales productivos. En el laboratorio de Reproducción Animal Asistida (Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, UAM-I) se resguarda material biológico de ovinos productivos y silvestres, que es utilizado en las técnicas de reproducción animal asistida, como la clonación de embriones. El objetivo del presente trabajo es difundir información relevante, relacionada con la implementación de un banco de germoplasma en la UAM-I. En una primera etapa, se efectuó la deriva de células somáticas a partir de biopsias de piel de ovinos. Hasta el momento se han obtenido fibroblastos y queratonicitos derivados de piel de oreja de borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) hembra y macho, así como de diferentes razas de borregos domésticos (*Ovis aries*) selectos genéticamente (Suffolk, Charollais y Pelibuey). En una segunda etapa, las células almacenadas en el BG de la UAM-I se utilizaron para generar embriones clones de borregos cimarrones y borregos domésticos, por la técnica de clonación manual. Se han obtenido embriones en etapa de blastocisto con eficiencias del 15% en borrego cimarrón y 35% en borrego doméstico. En una tercera etapa, se efectuarán las transferencias de los embriones clones de ovinos domésticos, en borregas receptoras. En conclusión, la implementación del Banco de Germoplasma en la UAM-I, ha permitido resguardar tejidos y células somáticas de borregos domésticos y silvestres, para la producción de embriones clones como una alternativa de conservación.

INTRODUCCIÓN

La biodiversidad en el mundo es producto de la evolución. Muchas de las especies surgieron hace millones de años y cada especie interacciona con otras dentro de un ecosistema, realizando un papel fundamental, pues toda especie está vinculada. Además, cada una de las especies contiene un recurso genético, producto de los cambios y adaptaciones que el ambiente le ha propiciado a sus poblaciones, lo que le ha permitido sobrevivir. La ciencia ha descrito entre 1.5 y 2 millones de especies, muchas de las cuales se encuentran actualmente en alguna categoría de riesgo o en vías de extinción. Este proceso se ha acelerado debido a las actividades antropogénicas y se creó que se está viviendo una Sexta Extinción masiva (Ceballos *et al.*, 2010).

Como una alternativa para recuperar o conservar algunas especies susceptibles a perderse, se han desarrollado biotecnologías que tienen como objetivo recuperar y conservar las poblaciones, sobre todo aquellas que se encuentran muy vulnerables o que son de importancia alimentaria. Una opción son los denominados Bancos de Germoplasma (BG), que son lugares donde se depositan diferentes materiales biológicos, con la finalidad de conservar el genoma de la especie y de esta manera evitar que se pierda la diversidad genética por presión de factores ambientales, físicos, biológicos y actividades humanas (Paniagua-Chávez *et al.*, 2011; Miguel, 2019).

En los BG se almacenan gametos, embriones, células somáticas o tejidos, de las especies animales que se desea conservar, para lo cual se utilizan diferentes técnicas de criopreservación como son la congelación de células y la vitrificación de ovocitos y embriones. Este material biológico es utilizado en las diferentes biotecnologías para la reproducción animal, tales como: la inseminación artificial, la fertilización *in vitro*, la clonación y la transferencia de embriones por mencionar algunas (Ugalde,

2014). El material resguardado puede ser de especies domésticas de valor económico para la ganadería, piscicultura y la agricultura, que permite la producción de especies para la alimentación del ser humano. Por ejemplo, en la ganadería existen BG que preservan muestras genéticas de las razas autóctonas de los animales de granja (Arando *et al.*, 2014), donde se incluyen especies prioritarias de bovino para la producción de carne y leche. Asimismo, incluyen material biológico de los pequeños rumiantes como son los ovinos y caprinos, de ganado porcino y de aves, para la producción de carne y huevo. Los BG también tienen un papel fundamental en la investigación para la criopreservación de germoplasma y de tejidos de especies en peligro de extinción (Navarro-Maldonado *et al.*, 2004; Sánchez-Reyes *et al.*, 2011). Esto con la finalidad de proteger, recuperar y reintroducir especies extirpadas de la vida silvestre, su área de distribución histórica.

El resguardo del material genético en los BG, ha permitido la recuperación de especies consideradas extintas. Tal es el caso de la cabra silvestre bucardo o Ibex de los Pirineos (*Capra pyrenaica pyrenaica*), de la que en 1999 se obtuvieron fibroblastos derivados de biopsias de piel criopreservadas, de una última hembra viva, y posteriormente fue clonada utilizando ovocitos maduros de una cabra doméstica superovulada. Los ovocitos fueron enucleados y sometidos a electrofusión, con los fibroblastos de bucardo (Folch *et al.*, 2009).

Con respecto a la producción de embriones clones de animales domésticos, esta biotecnología ha sido utilizada en mayor proporción por diversos países, con miras a la mejora reproductiva de animales de importancia económica, tales como: caballos (Galli *et al.*, 2003; Lagutina *et al.* 2005), mulas (Woods *et al.*, 2003), bovinos (Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2008), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999; Keefer *et al.*, 2002), porcinos (Polejaeva *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002) y lepóridos (Chesne *et al.* 2002). También ha sido utilizada para producir embriones de animales silvestres en peligro de extinción como: el Gaúr asiático (Lanza *et al.*, 2000), el lobo gris (Kim *et al.*, 2007), ballenas (Bhuiyan *et al.*, 2010) y ovinos silvestres como el Muflón (Loi *et al.*, 2001) y el Borrego Cimarrón (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2016; Vázquez, *et al.*, 2017), entre otros.

Los BG cuentan con muestras biológicas obtenidas de zoológicos, criaderos o ranchos cinegéticos, aprovechando el manejo rutinario de los animales, como el marcaje por aretado o el despezuñe, entre otros, para aprovechar y tomar una pequeña muestra de piel (0.5cm²) (Navarro *et al.*, 2016). A partir de este tejido, se derivan células somáticas (fibroblastos) que luego serán utilizadas como carioplastos en los programas de clonación por transferencia nuclear (Vázquez *et al.*, 2017). Los BG pueden almacenar biopsias de tejidos, como piel, pulmón, hígado de células de la granulosa de animales *post mortem*, aún después de varias horas de haber muerto el individuo, para posteriormente derivar fibroblastos de estos tejidos para la clonación de embriones (Hernández, 2017).

Con el presente trabajo, se difunde información relevante sobre la obtención y el resguardo de células de especies ovinas de importancia ganadera y ecológica, mediante las técnicas de conservación *ex situ*.

METODOLOGÍA

Se derivaron células de piel de ejemplares vivos y *post mortem* de ovinos domésticos y silvestres, siguiendo con algunas modificaciones la metodología descrita por Navarro-Maldonado *et al.* (2015). Se desinfectó con jabón y alcohol el borde inferior de una de las orejas de ejemplares ovinos domésticos y silvestres vivos, y se rasuró con una navaja de afeitar. Posteriormente se obtuvieron biopsias de piel de oreja de aproximadamente 1 cm² con ayuda de un bisturí (No. 22), aplicando azul de metileno o nitrato de plata en spray sobre las heridas para su cicatrización.

En el caso de los animales *post mortem*, se obtuvo un trozo de oreja de 1cm² que se trasladó en hielo al laboratorio.

Las muestras tanto de animales vivos como los *post mortem*, se les retiró el exceso de pelo y se desinfectaron en una solución de cloro al 1% durante 10 minutos, después se lavaron y se transportaron al laboratorio en 5 mL de solución salina amortiguada por fosfatos de Dubecco (DPBS, In Vitro, S.A.), sin calcio ni magnesio, suplementado con 2% de antibiótico y antimicótico (Penicilina G sódica 10.000 UI/mL, Sulfato de estreptomycin 10.000 µg/mL, Anfotericina B solubilizada 25 µg/mL, In Vitro, S.A.).

Una vez en el laboratorio, las muestras de piel de oreja de cada ejemplar ovino doméstico o silvestre se trabajaron por separado, procesándolas para la disgregación mecánica y enzimática. Para el primer procedimiento las muestras, bajo esterilidad, se fragmentaron con bisturí sobre cajas de Petri de 35 mm de diámetro, después se adicionaron 3 mL de DMEM-S (Dulbecco's Modified Eagle Medium, In Vitro, S.A.) suplementado (Antibiótico-antimicótico y 10% de Suero Fetal Bovino, SFB, Microlab) y se incubaron a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación (Incubadora de CO₂, Binder serie CB-150). Para la disgregación enzimática, las muestras se fragmentaron antes de colocarlas en tubos de fondo cónico de 15 mL con una solución de colagenasas I (17100-017, Gibco) y II (17101-015, Gibco) al 0.02%. Los tubos se mantuvieron a 37°C durante 3 horas en oscilación constante. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregaron 4 mL de DMEM-S a la solución de disgregación y se retiraron los remanentes de piel no disgregados, para cultivarse como explantes en cajas de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-S. La solución obtenida de cada disgregación se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, adicionando 4 mL DMEM-S para lavar y volver a centrifugar. El sobrenadante se descartó y los botones celulares se sembraron en cajas de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-S, incubando a las condiciones antes mencionadas. A las 24 horas se evaluaron las derivas celulares.

A los 7 días de cultivo *in vitro* se realizaron los pasajes celulares, para lo cual se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri y se realizaron dos lavados con DPBS, se agregaron 700 µL de tripsina-verseno (0.05%, In Vitro, S. A. en solución salina de fosfatos sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺) y se dejó incubando bajo las condiciones antes mencionadas durante 5 minutos o hasta que las células se despegaron por completo de la base de las cajas Petri. Para detener la reacción enzimática se agregaron 2 mL de DMEM-S y esta solución se centrifugó a 150 x g por 4 minutos a temperatura ambiente. Se decantaron los sobrenadantes y la mitad de la población celular derivada de la piel de cada ejemplar ovino doméstico o silvestre, se resembró por separado en cajas Petri, mientras que la otra mitad se criopreservó. Las células se resembraron en nuevas cajas de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-S, y se volvieron a incubar bajo las condiciones descritas para continuar con los pasajes celulares. Para la criopreservación, las células se resuspendieron por separado en 1 mL de medio de congelación (In Vitro, S. A.), colocándolas en criotubos de 1.5 mL. Los criotubos fueron rotulados para identificar la especie y el individuo de la que fueron obtenidas las células de piel, así como la fecha y se congelaron a -20 °C, durante 24h, para posteriormente exponerlos a los vapores del nitrógeno líquido por 15 minutos y finalmente sumergirlos en el nitrógeno líquido a -196 °C, donde se mantienen almacenadas en tanques de 20 litros.

RESULTADOS

En la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en el laboratorio de Reproducción Animal Asistida se cuenta con un Banco de Germoplasma donde se resguardan fibroblastos de piel de especies de ovinos de importancia comercial y silvestre, con la finalidad de preservar dicho material y utilizarlo en la clonación de embriones.

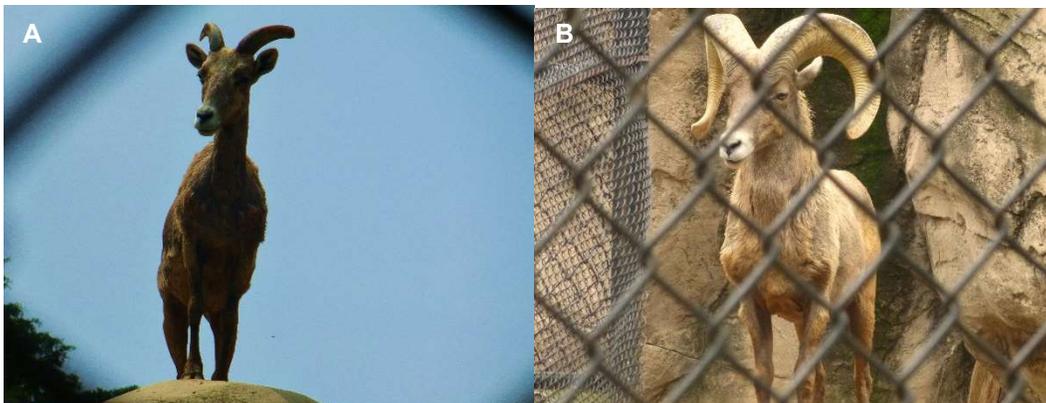


Figura 1. Ejemplares de borregos cimarrones (*Ovis canadensis mexicana*), A) hembra y B) macho de los cuales se tiene material genético resguardado en el banco de germoplasma de la UAM-I.

Hasta el momento, se han logrado derivar células de piel de la oreja y dorso de borregos cimarrones (*Ovis canadensis mexicana*), tres hembras y un macho adultos obtenidos por el permiso de colecta científica SGPA/DGVS/07250/15 (Figura 1). En estudios previos se realizó la identificación por inmunocitoquímica, de los tipos celulares derivados de piel, identificándose fibroblastos y queratinocitos en cultivos *in vitro* (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).



Figura 2. Ejemplares de borregos domésticos (*Ovis aries*), hembras de las razas A) Pelibuey y B) Suffolk de los cuales se tienen material genético en el banco de germoplasma de la UAM.

Estos fibroblastos se incorporaron al banco de germoplasma de la UAM-I.

También se lograron derivar células de los ovinos domésticos y se tiene el resguardo de fibroblastos de piel de tres diferentes razas de la especie *Ovis aries* selectos genéticamente a considerar por sus excelentes parámetros productivos reproductivos: Sufflok, Charollais y Pelibuey (Figura 2 y 3).

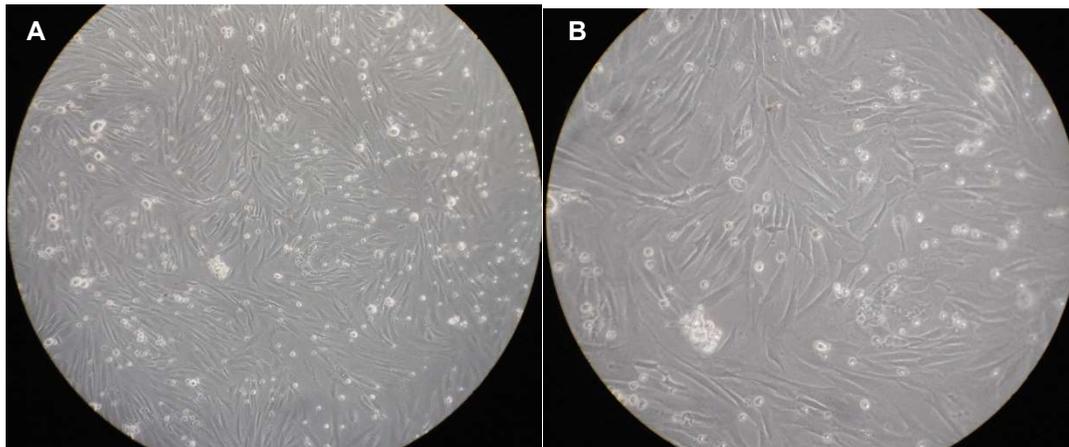


Figura 3. Fibroblastos de ovino raza Suffolk en campo claro con 100% de confluencia, A) 20x y B) 40x.

Las células están resguardadas en el banco de germoplasma de la UAM-I, y han sido utilizadas como donadoras de información genética para la producción de embriones por clonación manual. Para ello, las células de piel de cada especie, han sido fusionadas con ovocitos de borregas domésticas sacrificadas en rastro. Hasta el momento, se han obtenido embriones en etapa de blastocisto con eficiencias que van del 14% al 35% y se han efectuado los primeros ensayos para su transferencia

en hembras receptoras para su implantación, gestación y posible nacimiento de crías, aunque aún esto no ha sido posible (Vázquez *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

La conservación “*ex situ in vitro*”, denominada Banco de Germoplasma, es una biotecnología que nos permite actuar en poblaciones extremadamente amenazadas, sin separarlas completamente de su contexto zootécnico. Este método debe interponerse entre la conservación “*in situ*” y la conservación “*ex situ*”, como una alternativa para la conservación de la biodiversidad y de organismos útiles al ser humano. El establecimiento del Banco de Germoplasma en el Laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la UAM-I, representa un avance significativo en la conservación de material genético de borrego cimarrón y de diferentes razas de ovinos domésticos, como una estrategia de preservación de especies de ovinos silvestres amenazados y de razas de ovinos de importancia económica en nuestro país, los cuales han sido utilizados en la producción de embriones clones.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr Juan Arturo Rivera Rebolledo, del Zoológico de San Juan de Aragón por su apoyo para obtención de las muestras de piel en borrego cimarrón. Al Dr Raymundo Rangel Santos de la Universidad Chapingo y Dr Ernesto Hernández Pichardo de la UAM-Xochimilco por la obtención de muestras de piel del borregos domésticos selectos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arando, A., Nogales, S., Camacho, M. A., Pizarro, G., Miranda, A., Judith, C., Navas, F. J., Miro-Arias, M. 2014. Estudio económico del mantenimiento de un banco de germoplasma animal. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 4:100-102.
2. Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17(5):456-61.
3. Bhuiyan M., Suzuki Y., Watanabe H., Lee E., Hirayama H., Matsuoka K., Fujise Y., Ishikawa H., Ohsumi S., Fukui Y. 2010. Production of sei whale (*Balaenoptera borealis*) cloned embryos by inter and intraspecies somatic cell nuclear transfer. *The Journal of Reproduction and Development* 56(1):131-139.
4. Ceballos, G., García, A. y Ehrlich, P. H. 2010. The sixth extinction crisis: loss of animal populations and species. *Journal of Cosmology* 81: 821-1831.
5. Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard, J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 20:366-369.
6. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
7. Folch J. Cocero M. J. Chesné P. Alabart J. L. Domínguez V. Cognié Y. Roche A. Fernández-Arias A. Martí J. I. Sánchez P. Echegoyen E. Beckers J.F. Bonastre A. S. Vignon X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 71(6):1026-34. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.11.005. Epub 2009 Jan 23.
8. Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424(6949):635-635.
9. Hernández M. Sarahí, Hernández P. Jose E., Vazquez A. José R., Ambríz G. Alonso D., Navarro M. María C. 2020. Developmental dynamics of cloned mexican bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) embryos using morphological quality standards, *Veterinary Medicine and Science*, doi: 10.1002/vms3.242.

10. Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
11. Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction* 66:199-203.
12. Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hwang, W.S. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9(1):130-137.
13. Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* 130:559-567.
14. Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Damiani, P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2(2):79-90.
15. Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* 19(10):962-964.
16. Miguel E., J. 2019. Bucles de extinción. Estudios interdisciplinarios sobre nuevas tecnologías, mercados expansivos y biodiversidad. Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad. 235 págs.
17. Navarro M.M.C., Hernández M.S., Martínez I.J.L., Vázquez A.J.R., Ambríz G.D.A., Rangel S.R., Vajta G. 2016. Clonación de embriones de *Ovis aries* utilizando fibroblastos preservados 14 meses. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3(4):45-53.
18. Navarro-Maldonado MC., Hernández-Martínez S., Vázquez-Avedaño JR., Martínez-Ibarra JL, Zavala-Vega NL, Vargas-Miranda B., Rivera-Rebolledo JA., Ambríz-García DA. 2015. Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma. *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)* 31(2), pp. 275-282.
19. Navarro-Maldonado, MC., Matsumura P. D. y García A. R. 2004. La clonación: ¿Fruto del bien o del mal?. *Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería*, 3ª. Época, 51:43-56.
20. Paniagua-Chávez, C. G., Ortiz-Gallarza, S. M., Aguilar-Juárez, M. 2011. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidrobiológica* 21(3):415-429.
21. Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dal, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Coleman, A., Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.
22. Sánchez-Reyes, G., Ambríz, G. D., Navarro, M. M. C. 2011. La reproducción animal asistida: un instrumento para el concierto de la conservación. *Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería* 81:62-67.
23. Ugalde R. J. (2014) Biotecnologías reproductivas para el siglo XIX. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 48:33-34.
24. Vázquez A. J. R., Hernández M. S., Hernández P. J. E., Rivera R. J. A., Ambríz G. D. A., Navarro M. M. C. 2017. Producción de blastocistos de hembra *Ovis canadensis mexicana* por clonación manual interespecífica: Efecto del uso de medio secuencial humano. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*. 33(2): 328-338.
25. Woods G. L., White K. L., Vanderwall D. K., Li. G. P., Aston Kl., Bunch T. D., Meerdo L. N. Pate B. J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
26. Yin X.J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biology of Reproduction* 67:442-446.
27. Yun J.I., Koo B.S., Yun S.W., Lee C.K. 2008. *In vitro* development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos derived from murine embryonic fibroblasts and bovine oocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(11): 1665-1672.

ANÁLISIS DE GRUPOS FUNCIONALES PRESENTES EN EXTRACTO ACUOSO DE HIERBA DE LA CALAVERA (*CUPHEA PROCUMBENS*) UTILIZANDO FTIR

Bertha Fenton Navarro ^{1*}, Ulises Carranza Nuñez²⁺, Alonso Villalón Cueto^{2°}

¹Laboratorio de Glicobiología. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. UMSNH. ²Laboratorio Alfa de Polímeros. Facultad de Ingeniería Química, UMSNH.

*bertha00_mx@yahoo.com, *uli_carranza@hotmail.com, °alons_o2@hotmail.com

RESUMEN

Introducción: Las moléculas absorben energía de la luz en longitudes de ondas específicas, conocidas como sus frecuencias de resonancia (vibración), lo que constituye el principio de la espectrometría molecular. La región infrarroja del espectro hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000 a 650 cm^{-1} respectivamente. En la región infrarroja del espectro, las frecuencias de resonancia (vibración) de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales moleculares. Un grupo funcional es simplemente un grupo de dos o más átomos, enlazados de una manera específica. En la molécula de agua (H_2O), el grupo funcional O- es el que contribuye a la frecuencia de resonancia (vibración) alrededor de los 3284 cm^{-1} . La transformada de Fourier se usa como método matemático para el desarrollo en serie de la curva obtenida. La espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (*FTIR*) es una técnica muy versátil, ampliamente utilizada en aplicaciones químicas, especialmente para identificar los polímeros y compuestos orgánicos en una muestra. La hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*) es una planta que se utiliza para diversas afecciones como catarro, indigestión cáncer y como hipoglucemiante. Objetivo: Identificar los grupos funcionales presentes en extracto acuoso de hierba de la calavera. Material y Métodos: Extracto acuoso de hierba de la calavera. Reactivos con grado analítico. El extracto acuoso fue concentrado por destilación simple hasta obtener un polvo, posteriormente fue pulverizado con un cribado malla 200. Se colocaron 7 mg en el equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum 400. El análisis se realizó en reflectancia total atenuada (*ATR*). Resultados: Los grupos funcionales encontrados en los extractos sólidos de la hierba de la calavera de mayor a menor fueron: 1) fenoles y enlaces glucosídicos C-O, 2) enlaces insaturados C=C, 3) grupos hidroxilo con la capacidad para formar enlaces de hidrógeno OH, 4) metilenos CH y 5) ésteres y ácidos carboxílicos C=O. Conclusión. La hierba de la calavera posee grupos funcionales relacionados con metabolitos secundarios presentes en las plantas, con los que se pueden relacionar con sus funciones biológicas.

Palabras clave: *FTIR*, grupos funcionales, hierba de la calavera.

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para reconocer sustancias químicas; al reemplazar el ojo humano por detectores de radiación se puede estudiar la absorción de sustancias, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo. Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda¹.

La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía¹.

TEORIA

La espectroscopía molecular es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, que será de distinta naturaleza en función de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud de onda).²

La espectroscopia infrarroja que también se conoce como espectroscopia IR o espectroscopia vibracional, implica la interacción de la radiación infrarroja con la materia. Cubre una gama de técnicas, en su mayoría basadas en espectroscopia de absorción. Al igual que con todas las técnicas espectroscópicas, se puede utilizar para identificar y estudiar sustancias químicas. Las muestras pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas².

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de medición que permite registrar espectros infrarrojos. Se utiliza para medir cuanta luz absorbe una muestra a una determinada longitud de onda. La luz infrarroja se guía a través de un interferómetro (permite medir distancias con una precisión muy alta) y luego a través de la muestra (o viceversa). Un espejo móvil dentro del aparato altera la distribución de la luz infrarroja que pasa a través del interferómetro^{2,3}.

La señal directamente grabada, llamada "interferograma", representa la salida de luz en función de la posición del espejo. El eje horizontal es la posición del espejo, y el eje vertical es la cantidad de luz detectada (Figura 1). Estos son los "datos sin procesar" que se pueden transformar en Fourier para obtener el espectro real. Donde la salida de luz en función de la longitud de onda infrarroja (o equivalente, número de onda). Así, los datos se recopilan y convierten de un patrón de interferencia a un espectro.

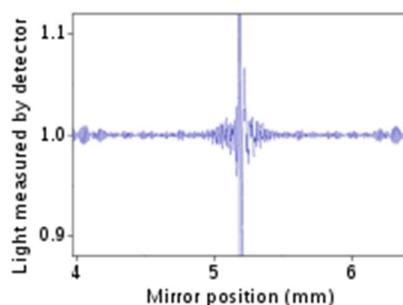


Figura 1. Interferograma de FTIR. El pico central representa la diferencia de ruta nula o retardo cero, donde la mayor cantidad de luz pasa por el interferómetro o detector.

https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier-transform_infrared_spectroscopy

La espectroscopia infrarroja es una técnica simple y confiable ampliamente utilizada en química orgánica e inorgánica, en investigación y en la industria. Se utiliza en aplicaciones de control de calidad, medición dinámica y monitoreo, como la medición a largo plazo sin supervisión de las concentraciones de CO₂ en invernaderos y cámaras de crecimiento mediante analizadores de gases infrarrojos. Este método es rápido, económico y no es invasivo para obtener las características químicas de una muestra biológica. Permite la identificación de los principales grupos funcionales y enlaces químicos, por lo que provee información de los componentes bioquímicos presentes en una muestra^{3,4}.

La FTIR es más útil para identificar productos químicos que son orgánicos o inorgánicos. Como es una herramienta efectiva para el análisis químico de un material biológico, se emplea para cuantificar algunos componentes de una mezcla desconocida de sólidos, líquidos y gases. Se puede utilizar para identificar productos químicos de derrames, pinturas, polímeros, recubrimientos, medicamentos y contaminantes. Y es quizás la herramienta más poderosa para identificar tipos de enlaces químicos (grupos funcionales)⁵.

La longitud de onda de la luz absorbida es característica del enlace químico. Los espectros de compuestos puros son generalmente tan únicos que son como una "huella digital" molecular. Mientras que los compuestos orgánicos tienen espectros muy ricos y detallados, los compuestos inorgánicos suelen ser mucho más simples. Para los materiales más comunes, el espectro de un desconocido se puede identificar en comparación con una biblioteca de compuestos conocidos. Para

identificar materiales menos comunes, el IR deberá combinarse con resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, espectroscopía de emisión, difracción de rayos X y / u otras técnicas ^{6,7}. Los metabolitos secundarios de las plantas aromáticas son responsables de su olor (terpenos), pigmentación (quinonas y taninos) y sabor (terpenos). Algunos de los extractos de esas plantas son compuestos naturales, mezcla de varios compuestos, como terpenoides y fenoles, a los que se les atribuyen propiedades antisépticas, antifúngicas, antioxidantes y antitumorales ⁸. Los extractos contienen monoterpenos (C10), moléculas que constituyen 90 % de los aceites esenciales, existen en gran variedad de estructuras y se componen de radicales funcionales como carburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles ⁹. También contienen sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) y los politerpenos (C > 40) ¹⁰.

Las plantas medicinales se utilizan como medicina alternativa para tratar diferentes padecimientos, con menos efectos adversos en comparación con fármacos sintéticos, la identificación de la naturaleza química de un compuesto fitoquímico presente en plantas medicinales, proveerán información de los diferentes grupos funcionales responsables de sus propiedades medicinales¹¹.

Las plantas contienen un gran espectro de sustancias bioquímicas sintetizadas por procesos primarios y secundarios. Estos metabolitos por lo general tienen un papel muy importante en la defensa de la planta, señalización interferencia con actividades enzimáticas y hormonales y la cura de enfermedades ³. Actualmente es esencial validar el perfil fitoquímico de las plantas medicinales utilizando muchas y diferentes técnicas sofisticadas, dentro de ellas FTIR.

Los enlaces químicos son cruciales en la estructura de cualquier químico que determina el rumbo de una reacción metabólica en un sistema biológico *in vivo*, ¹² ya que el grupo funcional en una biomolécula, como grupos hidroxilo, metilo, carbonilo, sulfidrilo, que pueden participar en una reacción bioquímica específica. La presencia de grupos funcionales afecta las propiedades químicas y físicas como el punto de fusión, de ebullición, polaridad, momento dipolar, solubilidad, etc. Por ejemplo, una molécula con una función polar fuerte puede ser predictor de un punto de fusión y ebullición alto, en comparación con una molécula no polar. Además, una molécula polar se disuelve de forma preferente en un solvente polar ¹³.

La planta *Cuphea procumbens* pertenece a la familia Lythraceae conocida también por el nombre de hierba de la calavera (Arizaga, 2007), hierba del cáncer, nube azul, atlanchana, macachampa de milpa y pegajosa. Los nombres purépechas que recibe son Calaver tsistiki cuya traducción sería "flor calavera" y Azul tsitsiki que significa "flor azul". Es endémica de México.

Los datos de la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana especifican que la hierba tiene una altura aproximada de 20-60 cm de largo, es muy ramificada, el tallo tiene presencia de pelos que pueden ser blancos o morados. La hoja puede tener forma angosta con los márgenes ligeramente enrollados hacia debajo de 7 cm de largo y de 7-15 mm de ancho. Las flores son velludas de color púrpura concentradas en la parte superior de los tallos. La planta se emplea para el catarro, el empacho, el cáncer y como hipoglucemiante. ^{14,15}



Figura 2. Hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*)¹⁵.

OBJETIVO

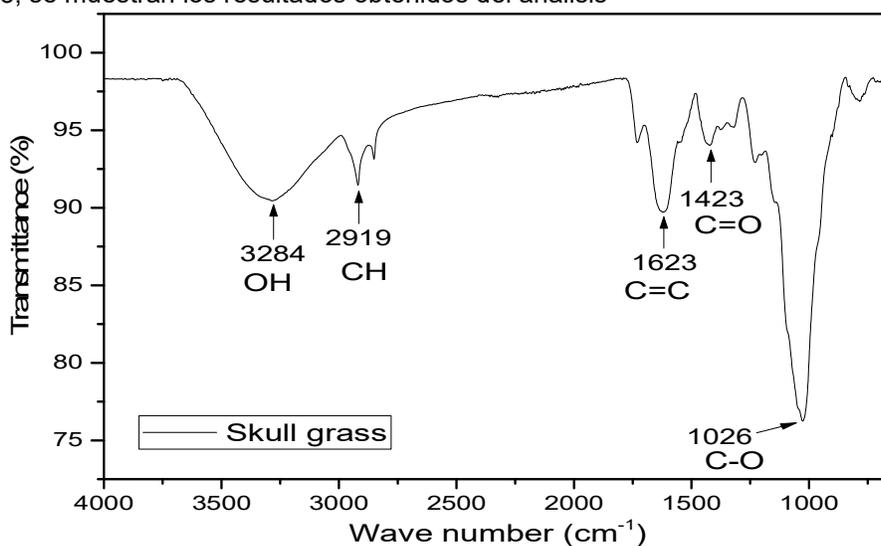
Identificar los grupos funcionales presentes en extracto acuoso de Hierba de la calavera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracto acuoso de hierba de la calavera. Reactivos con grado analítico. El extracto acuoso fue concentrado por destilación simple hasta obtener un polvo, posteriormente fue pulverizado con un cribado malla 200. Se colocaron 7 mg en el equipo FTIR Perkin Elmer Spectrum 400. El análisis se realizó en reflectancia total atenuada (ATR).

RESULTADOS

En la figura 3, se muestran los resultados obtenidos del análisis



En la siguiente tabla se presentan los grupos funcionales encontrados y que compuesto químicos relevante corresponde a cada uno.

Tabla 1: Valores de los picos FTIR de extractos de *Cuphea procumbens*.

No.	Intervalo de energía(cm-1)	Valor del pico encontrado (cm-1)	Estiramiento de vibración y grupos funcionales específicos	Compuestos Químicos Relevantes
1.	3600-3200	3284	Estiramiento de Vibración O-H. Presencia de grupos fenólicos.	Compuestos aromáticos
2.	3000-2850	2919	Vibración C-H, presencia de alcanos	Compuestos alifáticos.
3.	1680-1620	1623	Enlaces insaturados C=C, presencia de alquenos	Compuestos alifáticos
4.	1680-1620	1423	Enlaces insaturados C=C, esterés y ácidos carboxílicos	Compuestos alifáticos
5.	1740-1720	1023	Enlaces C-O, presencia de grupos hidroxilo en alcoholes	Compuestos aldehídicos

CONCLUSION.

La hierba de la calavera posee grupos funcionales relacionados con metabolitos secundarios presentes en las plantas, con los que se pueden relacionar con sus funciones biológicas

BIBLIOGRAFIA

1. C. Brunatti y A. M. Martín, "Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e infrarrojo cercano".2020. <https://docplayer.es/7159731-Introduccion-a-la-espectroscopia-de-absorcion-molecular-ultravioleta-visible-e-infrarrojo-cercano.html>
2. <https://es.khanacademy.org/science/chemistry/electronic-structure-of-atoms/bohr-model-hydrogen/a/spectroscopy-interaction-of-light-and-matter>
3. T. Durak, J. Depciuch, "Effect of plant sample preparation and measuring methods on ATR-FTIR spectra results". *Environ Exp Bot*, Vol. 169, 103915, 2020, pp 1-13.
4. A.C.S. Talari, M.A.G. Martinez, Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman, "Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues". *Appl. Spectrosc. Rev.* 52, 2017, pp. 456–506.
5. M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, K.M. Dorling, et al. "Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials". *Nat. Protoc.* 9, 2014, pp: 1771–1791.
6. T.L. Eberhardt, X. Li, T.F. Shupe and C.Y. Hse, C.Y. "Chinese Tallow Tree (*Sapium Sebiferum*) utilization: Characterization of extractives and cell-wall chemistry". *Wood Fiber Sci.* Vol. 39, 2007, pp. 319-324.
7. K.M. Hazra, R.N. Roy, S.K. Sen and S. Laska, "Isolation of antibacterial pentahydroxy flavones from the seeds of *Mimusops elengi* Linn" *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 6 (12), 2007, pp. 1446-1449.

8. N. Uedo, H. Tatsuta, M. Lishi, N. Baba, H. Sakai, H. Yano, and T. Otani. "Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats". *Cancer Lett.* Vol. 137, 1999, pp. 131-136.
9. F.S. Bakkali, D. Averbeck, and Idaomar M. "Biological effects of essential oils a review" *Food Chem. Toxicol.* Vol. 46, 2008, pp. 446-475.
10. S. Burt "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods". *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 94, 2004, pp. 223-253.
11. S. Chandra, "Fourier transform infrared (Ft-Ir) spectroscopic analysis of *Nicotiana plumbaginifolia* (Solanaceae)". *J. Med Plant Studies* Vol. 7(1), 2019, pp. 82-85.
12. H. Hemond, E. Fechner "Chemical fate and transport in the environment". 3er ed. Elsevier, 2015.
13. J. Speight "Environmental organic chemistry for engineers". Elsevier, 2017
14. S Arizaga, "Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán", Morelia". 2017. UNAM-Campus Morelia.
15. S. Arizaga, A. Herrera, H.M. Cruz, M. Cervantes, "Monografía de las plantas medicinales de Michoacán. I. Hierbas y bejucos nativos". 2018. UNAM. México.

INDICE DE AUTORES

- Aguilar Doroteo Leticia 299
Aguilar Ocampo Diego Wenceslao 107, 249
Alba Cuevas Juana Elizabeth 159, 334
Alcala De Jesus Maria 236, 271
Alcalá González Rubí 69
Alcalá Mota Velásco Berenice 292
Alejo Iturbide Francisco 77
Alvarez Ramirez Erick Daniel 299
Ambríz García Demetrio Alonso 384
Andrade Espinosa Guillermo 124
Aranda Ledesma Nestor Everardo 150
Arcibar Orozco Javier Antonio 13
Avila Rodríguez Mario 221
Báez González Juan Gabriel 176
Baltazar Campos Hazael 13
Bañuelos Pineda Jacinto 107
Barron González María Porfiria 60, 150, 182, 279
Bazaldúa Rodríguez Aldo Fabio 40
Camargo Hernández Gabriela 107, 249
Cano Asseleih Leticia Margarita 211
Carmona Martínez Luis Alberto 260
Carranza Nuñez Ulises 400
Casas Lázaro Luis Diego 113
Casillas Corona Mariela 271
Castillo Velázquez Uziel 201
Castillo Romero Araceli 107, 249
Centeno Mendoza María de la Luz 87
Cervantes Zaragoza Jessica Berenice 364
Chávez Hernández Karina Viridiana 193, 364
Chavez Mantilla Roberto 107
Chávez Montes Abelardo 201
Chula Quinto Cecilia 144
Correa Figueroa José Luis 260
Cortés Zárate Rafael 107, 249
Cruz Granados Andrea 113
Cruz Hernández Mónica 156
Cruz Solorio Angelica 299
Cuellar Guevara Fabiola Lizeth 279
Díaz Godoy Raúl Venancio 144
Díaz Salazar Valeria Estefanía 69
Dublan Barragán Brenda S. 305
Eguiarte Lara Daniel Julio 279
Elizalde Arellano Cynthia 384
Escamilla Gallegos Karla Ivonne 4
Espinoza Mijangos Angela Jaquelin 346
Fenton Navarro Bertha 400
Fernández Delgado Oscar Efraín 310
Foroughbakhch Pournavab Rahim 4
Galaviz Hernández Carlos 355
Gallegos Saucedo Manuel de Jesus 107
Galván Valencia Marisol 355
García Bárcenas Alejandro 113
García Castañeda Cathleen Daiana 124
García Diaz Lorena 77
García Escalante Juan José 260
García Garza María Elena 82
García González Luis Deyvi 384
García Hernandez David Gilberto 40, 346
García Rubio Elisabeht 305
García Vieyra Esperanza 135, 206
Garin Aguilar Maria Eugenia 299
Gonzalez Cortes Juan Carlos 236
González Leal Maricela 26, 113, 339
González López Lucía Viridiana 242
González López Marco Antonio 254
González Muñoz María del Pilar 221
González Niño Eva Sarahi 69
Granados Garcia Maria Elena 236
Guisande Machado Camila 26
Gutiérrez Rubio Susan Andrea 249, 325
Guzman Campos Ana Elisa 77
Hernández-Chávez Abel 249
Hernández Galindo Maria del Carmen 99
Hernandez Giron Jose Martin 165
Hernandez Hernandez Leonardo 107, 249
Hernandez Iglesias Carlos Santiago 40
Hernández Perales Lililana 135, 206, 221
Herrejón Carmona Misael 372
Higareda Mendoza Ana Edith 372
Hinojosa Rincon Yareli Marlen 60
Huerta Hernández Rosa Gazmin 99
Israde Alcántara Isabel 271
Juárez Tovar Bryan Guadalupe 279
Kato Miranda Enrique 13
Lazalde Ramos Blanca Patricia 355
Lemus Vidal Monica 319
León Reyes María del Rosario 310
Leos Rivas Catalina 346
Letchipía de León Consuelo 260
Licea Guajardo Beatriz 60, 150
López Olivares Guadalupe 56, 380
López Torres Gabriela 292
López Vidal Juan Carlos 384
López Villarreal Sonia Martha 176
Lozolla Ortiz Javier Iván 242
Macías Reynoso Adriana Araceli 159, 334

- Marquez Lucio Maria Azucena 77
Martinez Martinez Rodrigo 99
Martinez Ortiz David Mizael 4
Martínez Rodríguez Diana Esmeralda 221
Mata Don Juan Gloria F. 305
Matus Castro Elia Net 99
Maya Sánchez Alejandra 124
Medina Castillo Madeleine 305
Medina Ortiz Valeria Alejandra 279
Medrano Lango Fernanda Nayeli 310
Meléndez Balbuena Lidia 56, 165, 380
Menchaca Arredondo Jorge Luis 182
Mendoza Miranda Juan Manuel 87
Meza Álvarez Irene Liliana 47
Mojarro de Dios Cynthia Xitlali 319
Montoya Hernandez Nayely Metzín 193
Morales Aguilar Jessica 135
Moreno Hernández Karen 305
Moreno Limón Sergio 82
Muñoz Palomeque Alejandrina 325
Nakagoshi Cepeda María Argelia Akemi 201
Narváez Padilla José Armando 56, 380
Navarro Jasso Jesús Salvador 260
Navarro Maldonado María del Carmen 384
Navarro Mendoza Ricardo 135, 206
Núñez Cardona María Teresa 144, 242
Núñez Vilchis Alejandro 113
Olivares-Trejo José de Jesús 254
Orona Tamayo Domancar 13
Orozco Corona Dulce Maria 260
Ortiz Verdín Alondra Anahí 305
Padilla Velasco Ana Lilia 56, 380
Páramo Vargas Javier 47
Pardo Galván Marco Aurelio 372
Pérez Hernández Raymundo Alejandro 40
Pérez Ladrón de Guevara Héctor 159, 334
Pérez Moreno Victor 26, 339
Quintanilla Licea Ramiro 346
Quiñones Gutierrez Yadira 60, 150, 182, 279
Quiroz Yebra Sofía Galilea 206
Ramírez Flores Mario 319
Ramírez Guerrero Paulina Anahí 69
Ramírez Mandujano Carlos Alberto 236
Ramírez Quezada María Guadalupe 47
Ramos Briseño Daniela 339
Rea López Miguel Ángel 26, 339
Rico Rodríguez Miguel Ángel 26, 339
Rivas Morales Catalina 4, 346
Robinson Fuentes Virginia A. 94
Robles Espinoza Kiabeth 325
Roces de Álvarez-Buylla Elena 319
Rocha Ramírez Agustín Hilario 87
Rodríguez Garza Ramón Gerardo 182
Rodríguez Luis Osvelia Esmeralda 40, 176, 201
Rodríguez Rojas Jorge Jesús 201
Rojas Flores Diana Itzel 94
Rosales Gómez Roberto Carlos 325
Rubio Chávez Lidia Ariadna 325
Ruiz Martínez Antonio 249
Ruiz Tagle Alejandro 165
Salazar Hernández Ma. del Carmen 87, 310
Salazar Hernández Mercedes 87, 310
Saldívar Vázquez Ana Karen 176
Sánchez Aguirre Oscar Antonio 211
Sánchez Casas Rosa María 201
Sánchez Cruz Cristhian 254
Sánchez González Gerardo 211
Sánchez Ibarra Claudia 69
Sánchez Martínez Violeta 94
Sánchez Medina Alberto 211
Saucedo García Yeudiel Itamar 99
Saucedo Lucero José Octavio 47
Silva Corona Mayra 236
Solorzano Salgado Paulina 260
Sosa Domínguez Adrián 26, 113, 339
Sosa Macías Martha Guadalupe 355
Soto Víctor M. 193
Soto García Victor Manuel 364
Soto López Ismael 56, 165, 380
Téllez Acosta Osvaldo 242
Torres Corona Nancy Carolina 242
Torres Falcón María 305
Torres Garza Guadalupe Lizbeth C. 82
Torres Magallanes José Antonio 319
Trejo Córdova Alfredo 384
Trejo Loa Ileana Stefanía 201
Treviño Garza Mayra 176
Valencia del Toro Gustavo 299
Valero de la Cruz Andrea Carolina 26
Vargas Miranda Bárbara 384
Vargas Obieta Laura 325
Vargas Rosas Adriana 242
Vega Carrillo Hector Rene 260
Vergara Hernández Abelardo Daniel 372
Vergara Hernández Jéssica Aneth 372
Vergara Luviano Isis Adileni 242
Vieyra Vargas Esteban 384
Villa Cruz Virginia 159, 334
Villalón Cueto Alonso 400
Villarreal Jorge 82

Villarreal García Laura Elena 176
Villarreal Garza Jorge Alberto 4
Yáñez Arellano Linda Zafiro 144
Yutani Martínez Paulina 69
Zapata Vázquez Yessica 355
Zelaya Molina Lily Xóchit 159
Zertuche Garza Javier 69